

523,982

Rec'd PCT/PTO 08 FEB 2005

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 2 月 19 日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/015415 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/50, 33/15, C12Q 1/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010163

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 8 日 (08.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-231999 2002 年 8 月 8 日 (08.08.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学  
技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOL-  
OGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川  
口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 財団法人大  
阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE  
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田市 古江  
台 6-2-4 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 垣塚 彰 (KAK-  
IZUKA, Akira) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田市 古  
江台 6-2-4 財団法人大阪バイオサイエンス研究所内 Osaka (JP). 亀井 康富 (KAMEI, Yasutomi) [JP/JP];  
〒565-0874 大阪府 吹田市 古江台 6-2-4 財団法人  
大阪バイオサイエンス研究所内 Osaka (JP). 大泉 宏  
(OHIZUMI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田  
市 古江台 6-2-4 財団法人大阪バイオサイエンス  
研究所内 Osaka (JP).(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042  
東京都 渋谷区 宇田川町 3 7-1 0 麻仁ビル 6 階  
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受  
領の際には再公開される。2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING DRUG

(54) 発明の名称: 薬剤スクリーニング方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of screening a substance which serves as the active ingredient in a remedy for obesity and/or diabetes. This method comprises treating cells or an animal individual with candidate substances and specifying a candidate substance fulfilling one or more of the following requirements as the target active substance: (a) elevating the expression dose of a ligand ERRL1 of a nuclear receptor ERR; (b) elevating the transcriptional activity of the nuclear receptor ERR; (c) promoting the binding of EERL1 to EER; and (d) elevating the expression dose of an MCAD gene product.

(57) 要約: 肥満および/または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法を提供する。この方法は、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準:(a)核内受容体ERRのリガンド因子ERRL1の発現量を増加させる;(b)核内受容体ERRの転写活性を増加させる;(c)ERRL1とERRの結合を促進させる;(d)MCAD遺伝子産物の発現量を増加させる、のいずれか1以上を満たす候補物質を目的の有効成分物質として特定する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/015415 A1

## 明細書

## 薬剤スクリーニング方法

5

## 技術分野

この出願の発明は、核内受容体 ERR (estrogen receptor-related receptors) のリガンド因子 ERRL1 発現および活性を指標として新規の肥満お  
10 よび/または糖尿病治療薬をスクリーニングする方法に関するものである。

## 背景技術

15 核内受容体によって調整される遺伝子発現の根底にあるもっとも典型的な分子機構は、その受容体のリガンド（例えば、ステロイド、レチノイン酸、甲状腺ホルモンおよびビタミン D<sub>3</sub> といった小さな脂溶性分子）の結合によって開始される (Mangelsdorf, D.J. et al., Cell 83:835-839, 1995)。このようなりガンドの内在レベルは、多段階の酵素反応を経て産生および/または分解へと至るよ  
20 うに厳格に調整されている (Honkakoski, P. & Negishi, M. Biochem. J. 347:321-337, 2000)。また、このようなりガンド類はまとめて脂溶性リガンドまたは内分泌系脂溶性ホルモンと呼ばれている。リガンドレベルを変えることにより、内分泌系は、体外または体内環境の変化に対して適応、つまりホメオスタシスに貢献している (Mangelsdorf, D.J. et al., Cell 83:835-839, 1995 ;  
25 Giguere, V. Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。このシステムは、リガンドの産生が複雑に制御されているので、ゆっくりと長期に適応させるには有利に見えるが、迅速に適応させるには不利に思える。一方、ゲノム分析によって、数多くの核内受容体様分子が存在することが予測されているが、それらに固有の脂溶性リガンドが同定されているものは現在までほとんど知られていない。これらの  
30 分子は、まとめて orphan 受容体（孤児受容体）と呼ばれている (Giguere, V.

Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。孤児受容体の活性化メカニズムはまったく分かっていない。エストロゲン受容体関連タンパク質 1 および 2 (ERR1 および 2) がまず初めに孤児受容体として同定され (Giguere, V. et al., Nature 331:91-94, 1988; Shigeta, H. et al., J. Mol. Endocrinol. 19:299-309, 5 1997)、またその第三メンバー (ERR3) が近年単離されている (Eudy, J.D. et al., Genomics 50:382-384, 1998; Hong, H. et al., J. Biol. Chem. 274:22618-22626, 1999)。ERR およびエストロゲン受容体は構造的に互いに類似性があるが、ERR はエストロゲンに反応しない (Giguere, V. Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。一方、ERR1 は中鎖アシル補酵素 A デヒドロゲナーゼ (MCAD)、すなわちミトコンドリア脂肪酸  $\beta$  酸化の主要酵素をコードする遺伝子に対する重要な転写レギュレーターとして作用すると提唱されている (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P., J. Biol. Chem. 272:31693-31699, 1997)。これらの知見によつて、ERR に媒介される遺伝子調節が、一般的には身体的運動によって誘導される脂肪酸  $\beta$  酸化を調節することによって、体内におけるエネルギーバランスを制御するに重要な役割を果たしているという可能性が導き出されている (Horowitz, J.F. & Klein, S., Am. J. Clin. Nutri. 72:558S-563S, 2000)。従って、適切な身体的運動を毎日行うことが、肥満および糖尿病に対抗するもっとも簡単でもっとも有効な方法であるとされている (Baldwin, K.M., J. Appl. 10 Physiol. 88:332-336, 2000)。

以上のとおり、核内の孤児受容体 ERR が MCAD 遺伝子発現の調節因子として作用し、この MCAD 遺伝子発現が脂肪酸  $\beta$  酸化を調節することによって体内におけるエネルギーバランスを制御し、これによって肥満や糖尿病に対する抵抗性を維持できると考えられる。しかしながら、このような一連のメカニズムの起 25 点となる受容体 ERR へのリガンド分子は未だ特定されていない。

一方、核内受容体分野における研究者達によって、SRC1/p160 族 (Onate, S.A. et al., Science 270:1354-1357, 1995)、P/CAF (Blanco, J.C.G. et al., 30 Genes Dev. 12:1638-1651, 1998) および CBP/p300 (Chakravarti, D. et al.,

Nature 383:99-103, 1996; Kamei, Y. et al., Cell 85:403-414, 1996) とい  
った数種類の転写補助因子タンパク質が核内受容体のリガンドに依存する転写を  
活性化させるに重要な役割を果たすということが明らかにされた。これらはいわ  
ゆる共活性因子（コアクチベーター）と呼ばれ、あまねく広く発現して、またそ  
5 の発現レベルは、細胞が分化している間変化することではなく、また外的および内  
的環境の変化に対応して変化することもないようである。さらに最近になって、  
PPAR $\gamma$  共活性因子-1（PGC-1）と称されるユニークな共活性因子が同定されて  
いる（Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998）。この共活性因子は、  
組織特異的かつ調整された発現をする点で他の共活性因子から区別される。すな  
10 わち、PGC-1 は褐色脂肪組織（BAT）、骨格筋、心臓、腎臓、脳において様々  
なレベルで発現され、BAT においては、寒冷ストレスに急に曝された後、あき  
らかに発現誘導される（Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998）。  
PGC-1 はまた絶食状態下においては、肝臓（Yoon, J.C. et al., Nature  
413:131-138, 2001）および心臓（Lehman, J.J. et al., J. Clin. Invest.  
15 106:847-856, 2000）中で発現誘導される。

PPAR $\gamma$  は、脂質生成の重要レギュレーターであることが知られており  
（Tontonoz, P. et al., Cell 79:1147-1156, 1994）、その発現は脂肪細胞分化  
中に増大する。また、糖尿病におけるインスリン抵抗性改善薬として開発された  
20 チアゾリジン（TZD）がこの PPAR $\gamma$  のリガンドとして働くことが示され  
（Lehmann et al., J. Biol. Chem. 270:12953-12956, 1995）、PPAR $\gamma$  の転  
写能活性化を指標とする新規糖尿病薬のスクリーニングが広く行われている。

しかしながら PPAR $\gamma$  の共活性因子である PGC-1 mRNA 量は、3T3-L1 細胞  
25 の脂肪細胞分化中には極めて低レベルである。従って、脂肪細胞分化中に機能す  
る PGC-1 とよく似た分子の存在が推定されていたが、この出願の発明者らは、  
PPAR $\gamma$  の新規結合因子 PGC2 を同定し、インスリン抵抗性糖尿病薬を開発する  
ための手段として、PGC2-PPAR $\gamma$  複合体の転写活性を調節するリガンド（特  
に、PGC2-PPAR $\gamma$  複合体の活性を低下させるリガンド）のスクリーニング方  
30 法を特許出願している（特開 2002-058489 号公報）。

## 発明の開示

- 5      この出願の発明者らは、肥満や糖尿病に対する抵抗性遺伝子 MCAD の発現調節因子である核内受容体 ERR のリガンド因子を探索した結果、この因子が、PPAR $\gamma$ のリガンド因子として先に同定された PGC2 であることを見出し、このタンパク質因子を ERRL1 (ERR ligand 1の略) と命名した。
- 10      この出願の発明は、発明者らによるこのような新規な知見に基づくものであり、PPAR $\gamma$ の作用機序とは全く異なり、核内受容体 ERR およびその標的遺伝子 MCAD が関与する抗肥満および抗糖尿病の内在性経路をターゲットとする薬剤スクリーニング方法を提供することを課題としている。
- 15      この発明は、前記の課題を解決するものとして、肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準：
- (a)核内受容体 ERR のリガンド因子 ERRL1 の発現量を増加させる；
  - (b)核内受容体 ERR の転写活性を増加させる；
  - 20      (c)ERRL1 と ERR の結合を促進させる；
  - (d)MCAD 遺伝子産物の発現量を増加させる
- のいずれか 1 以上を満たす候補物質を目的の有効成分物質として特定することを特徴とする方法を提供する。
- 25      またこの発明は、前記のスクリーニング方法によって特定された 1 以上の物質を有効成分として含有する肥満および／または糖尿病の治療薬を提供する。
- さらにこの発明は、核内受容体 ERR のリガンド因子 ERRL1 をコードする精製ポリヌクレオチドをゲノム DNA に保有し、リガンド因子 ERRL1 を過剰発現
- 30      するトランスジェニック非ヒト動物を提供する。

なおこの発明において、「ポリヌクレオチド」とはプリンまたはピリミジンが糖に  $\beta$ -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (ATP、GTP、CTP、UTP；または dATP、dGTP、dCTP、dTTP) が結合した分子を意味する。

5 具体的には、タンパク質をコードするゲノム DNA、ゲノム DNA から転写される mRNA、mRNA から合成される cDNA である。また、2 本鎖であっても 1 本鎖であってもよい。さらに、これらのゲノム DNA や mRNA、cDNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖も含まれる。また「タンパク質」および「ペプチド」とは、アミド結合 (ペプチド結合) によって互いに結合した複数個のアミノ酸残基から

10 構成された分子を意味する。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば

15 容易かつ確実に実施可能である。例えば、薬剤の調製は Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 に、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current

20 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

#### 図面の簡単な説明

25

図 1 は、ERRL1 および PGC-1 の間の一次アミノ酸配列の比較である。星印は同一のアミノ酸を示す。数字は、最初のメチオニンを 1 としたアミノ酸の位置を示す。LXXLL モチーフは太字で表す。下線はグルタミン酸 (E) 繰り返しおよびセリン-アルギニン (SR) に富む領域である。推定 RNA 結合モチーフは

30 箱で囲まれている。暫定的ドメインの境界は垂直線で示される。今回新たに同定

した ERRL1 のスプライシング変異体は、39 のアミノ酸（156 番目のロイシンから 194 番目のリジン）が欠けていた。

図 2 は、ERRL1 mRNA の発現プロファイル。A は、様々な成熟マウス組織由来の 20  $\mu$ g の全 RNA を ERRL1、PGC-1、PRC、ERR1、ERR3 cDNA をプローブとして使用して分析した結果である。28S RNA のエチジウムブロマイド染色も示す。B は、3T3-L1 細胞をデキサメタゾン、1-メチル-3-イソブチルキサンチンおよびインシュリン（0 日目に添加）による処理によって脂肪細胞に分化誘導し、RNA を単離し、ノーザンブロット分析した結果である。プロットは続いて、それぞれのプローブとハイブリダイズした。C は、3T3-L1 および 10T1/2 細胞中の ERRL1、ERR1 および MCAD mRNA の発現（-：前脂肪細胞、+：成熟脂肪細胞）を観察した結果である。

図 3 は、PGC-1 および ERRL1 の種々の核内受容体の「タンパク質リガンド」としてのプロファイル。様々な核内受容体に対する PGC-1 (A) および ERRL1 (B) の転写活性化能をトランスフェクションアッセイで調べた。実験を三連で行い、得られた平均値を誘導倍率として示し、ここでは、PGC-1 および ERRL1 の非存在下での各々の GAL4 融合核内受容体の Luc 活性が基準値とされている。エラー・バーは標準偏差。C は、ERRE を介する完全長 ERR が媒介する転写に対する ERRL1 の投与量に依存した活性。様々な量の pCMX-ERRL1 (0 から 200 ng) は、CV-1 細胞における 250 ng の TK-Luc または ERRE-Luc の存在下、30 ng の pCMX-ERR1 または pCMX-ERR3 と共にトランスフェクトされた。実験を三連で行いその平均値が誘導倍率として示される。ここでは、ERRL1 の非存在下で TK-Luc の Luc 活性が基準値となる。エラー・バーは標準偏差。D は、 $^{35}$ S 標識 ERRL1 は、in vitro で GST-ERR1 および GST-ERR3 と強力な相互関係を示すことを確認した結果である。オートラジオグラフは、プルダウンされたタンパク質 (GST-ERR1 および GST-ERR3)、および GST プルダウン分析に対して使用された  $^{35}$ S 標識 ERRL1 の全量の 10% (Input) を示す。この分析に使用された GST 融合タンパク質を含む SDS-PAGE ゲルの CBB 染色も示されている。E は、10T1/2 細胞における ERR1 または ERR3 と組み合わ

された ERRL1 または PGC-1 の外来性発現による MCAD mRNA の発現増加を示した結果である。細胞が集密後一日して、全 RNA を単離し、MCAD および ERRL1 cDNA をプローブとして使用してノーザン・プロット（レーンあたり 20  $\mu$ g）によって分析した。MCAD mRNA の相対的デンシメトリー値も各レーン

5   の下に記載した。

図 4 は、ERRL1 トランスジェニックマウスの作成。A は、ERRL1 トランスジーンおよびサザンプロット（プローブ 1）およびノーザンプロット（プローブ 1 およびプローブ 2）に使用されたプローブの位置の概略図を示す。B は、二つのトランスジェニック系（A1 および A2）において、各々トランスジーンの

10   10 および 12 のコピーが含まれていることを示す結果である。C は、ERRL1 マウス（A1 系）および同腹子のコントロールマウス由来の各組織における ERRL1 mRNA 発現のノーザンプロット分析の結果である。各レーンは、20  $\mu$ g の全 RNA を含んでいる。D は、ERRL1 トランスジェニックマウスおよび野生

15   型コントロールマウスの骨格筋における ERRL1、MCAD、ACC2 および UCP-3 の発現を測定した結果である。各グループの 3 匹のマウスを調べた。ノーザンシグナルの定量値（コントロールは 100%）を右に示す。データは、平均  $\pm$  s.e.m（\* は  $p < 0.05$ ）。

図 5 は、ERRL1 トランスジェニックマウスの表現型。A は、食物摂取を毎週測定し、表示された期間におけるマウスあたりの累積食物摂取を示す。データは平均  $\pm$  s.e.m（動物グループあたり  $n=6$ 、エラー・バーは記号より小さい、\* は  $P < 0.05$ 、\*\* は  $P < 0.01$ ）を示す。B は、ERRL1 トランスジェニックマウス（黒丸）と野生型コントロール（白丸）の体重変化を示す結果である。値は、体重の平均  $\pm$  s.e.m（動物グループあたり  $n=6$ 、\* は  $P < 0.05$ 、\*\* は  $P < 0.01$ ）を示す。幾つかのデータポイントにおいて、エラーバーは記号よりも小さい。C は、ERRL1 トランスジェニックマウスにおける腹部脂肪の減少を示す結果である。D は、野生型コントロールマウスと ERRL1 トランスジェニックマウスの精巢上体の WAT 重量の比較である。カラムは、WAT 重量  $\pm$  s.e.m.（動物グループあたり

20   

25   

30   り  $n=6$ 、\* は  $P < 0.05$ ）を示す。E は、ERRL1 トランスジェニックマウスと同



腹の野生型コントロールマウスの白色脂肪組織の形態の比較である。目盛りは  $50\mu\text{m}$  を示す。F は、脂肪細胞の平均直径。細胞の直径は E に示された切片から測定された ( $n=20$ 、\*\*は  $P<0.01$ )。G および H は、12 週齢のコントロールマウスと ERRL1 トランスジェニックマウスにおける、休息時 (G) および全体 (H) のエネルギー消費を示した結果である。カラムはエネルギー消費の平均値  $\pm$  s.e.m (動物グループにつき  $n=6$ 、\*は  $P<0.05$ 、\*\*は  $P<0.01$ ) を示す。

図 6A は、KKAy(+)ERRL1(-) (白四角、 $n=8$ )、KKAy(-)ERRL1(-) (白丸、 $n=5$ )、KKAy(+)ERRL1(+) (黒四角、 $n=5$ )、KKAy(-)ERRL1(+) (黒丸、 $n=5$ ) オスマウスの体重変化を測定した結果である。各グループの体重曲線を繰り返し測定分析 (スーパーANOVA) によって比較した。\*は  $P<0.05$ 、\*\*は  $P<0.01$ 。図 6B は、12 週齢のオス KKAy(+)ERRL1(-) (左)、KKAy(+)ERRL1(+) (中央)、KKAy(-)ERRL1(-) (右) マウスの典型的な写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明におけるリガンド因子 ERRL1 は、例えば特開 2002-058489 号公報の配列番号 1 に「マウス PGC2」として開示されているマウス ERRL1 (配列番号 2) である。さらにこのリガンド因子 ERRL1 としては、そのスプライシング変異体 (配列番号 2 の 156 番目のロイシンから 194 番目のリジンまでの 39 アミノ酸が欠失したもの) を対象とすることもできる。またマウス PGC2 のヒトホモログとして公知のヒト PERC (PPAR $\gamma$  coactivator  $\beta$  1: Entrez protein database No. NP\_573570) もヒト ERRL1 としてこの発明の対象とすることができる。またマウス ERRL1 をコードするポリヌクレオチドとしては、特開 2002-058489 号公報の配列番号 2 に塩基配列が開示されているマウス PGC2 cDNA (ERRL1 cDNA: 配列番号 1) を用いることができる。さらにヒト ERRL1 をコードするポリヌクレオチドは、前記ヒト PERC cDNA (GenBank No. NM\_133263) を用いることができる。さらにまた、例えばヒト PRRC 遺伝

子は染色体 5q33.1 領域に存在し、そのゲノム配列が公知である (GenBank No. NT\_029289)。従って、このゲノム遺伝子配列に存在するプロモーター領域を利用してこの発明を実施することもできる。

- 5      この発明における核内受容体 ERR は、ERR1、ERR2 または ERR3 (Giguere, V. et al., Nature 331:91-94, 1988; Shigeta, H. et al., J. Mol. Endocrinol. 19:299-309, 1997; Eudy, J.D. et al., Genomics 50:382-384, 1998; Hong, H. et al., J. Biol. Chem. 274:22618-22626, 1999) のいずれか 1 以上を対象とすることができる。またそれぞれをコードする cDNA も公知である。
- 10    例えば ERR1 cDNA は GenBank No. NM\_004451 として公知であり、ゲノム遺伝子 (染色体 11q13 領域) の配列は GenBank No. NT\_033903 として公知である。従って、この発明はこれらのポリヌクレオチド (cDNA、ゲノム DNA および遺伝子プロモーター領域の DNA 断片等) を用いて実施することができる。さらに MCAD 遺伝子もその cDNA が公知である (GenBank No. AF251043)。

15

- 以上のポリヌクレオチドは、それぞれ公知のヌクレオチド配列またはその一部配列からなる DNA 断片をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーや cDNA ライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。得られたポリヌクレオチドは、例えば、PCR (Polymerase Chain
- 20    Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法および SDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。また、cDNA の場合には、公知配列に基づいて合成した
- 25    プライマーを用いて、細胞から単離した mRNA を鋳型とする RT-PCR 法によっても目的 cDNA を得ることもできる。

- この発明の肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法は、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、前記のタンパク質因子
- 30    またはそれらをコードするポリヌクレオチドを対象として、以下のいずれか 1

以上の基準を満たす候補物質を目的物質として特定する。

(a)リガンド因子 ERRL1 の発現量を増加させる。

(b)核内受容体 ERR の転写活性を増加させる。

(c)ERRL1 と ERR の結合を促進させる。

5 (d)MCAD 遺伝子産物の発現量を増加させる。

すなわち先に説明したとおり、核内受容体 ERR が MCAD 遺伝子発現の調節因子として作用し、この MCAD 遺伝子発現が脂肪酸  $\beta$  酸化を調節することによって体内におけるエネルギーバランスを制御し、これによって肥満や糖尿病に対する抵抗性が維持されている。そして、後記の実施例に示したように、ERRL1  
10 がこのような一連のメカニズムの起点となる受容体 ERR へのリガンド分子であり、実際に ERRL1 の発現昂進がマウスの肥満や糖尿病に対する抵抗性獲得に顕著な効果を示すことが確認された。すなわち前記(a)~(d)の基準を満たす物質は、抗肥満および抗糖尿病メカニズムのプロセスにおいてそれぞれ作用する物質である。  
15

この発明の方法において、「候補物質」とは、未知および既知の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等を含有する。「細胞」とは、株化されたヒト細胞または非ヒト動物細胞、あるいはヒトまたは非ヒト動物個体の組織から単離し、培養条件下に適切に保たれた細胞である。株化細胞としては、3T3-L1 細胞株等の脂肪細胞を例示することができる。すなわち、後記実施例に示すように、ERRL1 タンパク質の発現はこの脂肪細胞の分化中に敏感に反応するため、目的物質の探索のための好ましい細胞である。あるいは、株化細胞や細菌（大腸菌等）に ERRL1 cDNA および／または  
20 ERR cDNA をトランスフェクトした細胞であってもよい。また、動物個体から単離した細胞としては、ERRL1 タンパク質が高度に発現されている BAT、心臓、骨格筋または腎臓等から単離した細胞を例示することができる。一方、非ヒト動物個体（例えばマウス）を対象とする場合には、この動物個体に候補物質を投与（全身または局所）、もしくは摂食ないしは摂飲させ、その動物個体の組織または  
25  
30 は細胞における前記基準(a)~(d)を測定する。その際に、この発明によって提供

されるトランスジェニック非ヒト動物を正の対照とすることができる。すなわち、このトランスジェニック非ヒト動物は ERRL1 タンパク質を過剰発現し、その結果として受容体 ERR および MCAD 遺伝子を高度に発現しているため、候補物質を投与した野性型マウスがこのトランスジェニック動物と同定度に前記基準を満たすか否かを測定することによって、候補物質の効果をより正確に判定することができる。また、このトランスジェニック非ヒト動物や野性型動物個体を対象とする場合には、高脂肪食の摂取、身体運動負荷等の処置を行うことや、あるいは摂食量や体重、エネルギー消費等を判定基準に加えることもできる。

- 10 前記の基準(a)~(d)の判定は、それぞれの遺伝子発現をその転写産物 (mRNA やタンパク質) の量を公知の方法によって測定することによって行うことができる。例えば in situ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロットイング、ドットプロット、RNase プロテクションアッセイ、RT-PCR、Real-Time PCR (Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193(2000)、およびそこで引用されている文献)、DNA アレイ解析法 (Mark Shena 編、"Microarray Biochip Technology", Eaton Publishing(2000 年 3 月)) などの公知の方法によって前記の基準(a)~(d)の判定が可能である。こうした技術を利用した肥満および/または糖尿病の治療薬の有効成分物質のスクリーニング、それに利用する試薬、方法、プロセス、解析プログラムなどは、すべてこの発明に含まれる。具体的判定としては、例えば以下の方法が例示される。
- 15 20

#### (A)リガンド因子 ERRL1 の発現量を増加させる物質のスクリーニング

- ERRL1 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼ cDNA と融合させたレポータープラスミッドを作成し、このレポータープラスミッドを細胞にトランスフェクション後、検討する候補物質を細胞に添加し、数日後に培養細胞抽出液内でのルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性を測定する。候補物質の添加によって、ルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの上昇が観察されれば、この物質には、ERRL1 遺伝子のプロモーターを活性化させる能力がある可能性が強く示唆される。つぎに、この候補物質を培養細胞に添加し、その後 ERRL1 遺伝子の mRNA の発現量の増加をノーザンブロット法や定量的
- 25 30

RT-PCR 法等で評価する。同様に培養細胞を用いて ERRL1 タンパク質の発現量の増加を抗 ERRL1 抗体を用いたウエスタンブロット法で評価することもできる。あるいは、候補物質を非ヒト動物に摂取させ、動物から単離した細胞（例えば、BAT、心臓、骨格筋または腎臓等）における ERRL1 mRNA 量や ERRL1 タンパク質量の増加を同様に評価してもよい。

#### (B)核内受容体 ERR の転写活性を増加させる物質のスクリーニング

培養細胞に、プロモーター領域に ERR 応答配列もしくは、gal4 応答配列を持つルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼのレポータープラスミッドを、それぞれ全長 ERR 蛋白質、もしくは ERR のリガンド結合領域と gal4 の DNA 結合領域とを融合させた蛋白質の発現ベクターと一緒にトランスフェクション後、検討する候補物質を細胞に添加し、数日後に培養細胞抽出液内でのルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性を測定する。候補物質の添加によって、応答配列の存在に依存してルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの上昇が観察されれば、この物質には、ERR の転写を活性化させる能力がある可能性が強く示唆される。つぎに、この候補物質を培養細胞に添加し、ERR の標的遺伝子、たとえば MCAD 遺伝子の mRNA の発現量の増加をノーザンブロット法や定量的 RT-PCR 法等で評価する。同様に培養細胞を用いて ERR の標的遺伝子産物、たとえば MCAD 蛋白質の発現量の増加を抗 MCAD 抗体を用いたウエスタンブロット法で評価する。あるいは、候補物質を非ヒト動物に摂取させ、動物から単離した細胞（例えば、BAT、心臓、骨格筋または腎臓等）における MCAD mRNA 量や MCAD タンパク質量の増加を同様に評価してもよい。

#### (C)ERRL1 と ERR の結合を促進させる物質のスクリーニング

イーストもしくは動物の培養細胞で、Two hybrid 法を用いて、ERRL1 と ERR の結合をルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性として定量する。その系に検討する候補物質を添加した時、非添加の場合に比べてルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼが上昇した場合、この物質には、ERRL1 と ERR との結合を活性化させる能力がある可能性が強く示唆される。続いて、免疫沈降法や GST-pul down アッセイにこの薬物を添加した場合、共沈する ERRL1 と ERR

のタンパク質量をウエスタンブロット法で評価する。一方、ERR タンパク質と ERR 応答配列を含むオリゴ DNA を用いたゲルレターデーションアッセイで、ERRL1 の添加によって super shift するシグナルの量がこの候補物質の添加によって増強するかどうかを指標に、この物質に ERL1 と ERR の結合を促進させる効果があるかどうかを確認することができる。さらに、Biacore 等の装置を用いた相互作用の検出アッセイ系にこの候補物質を添加することによって、この物質に ERL1 と ERR の結合を促進させる効果があるかどうかを確認することができる。

10 (D)MCAD 遺伝子産物の発現量を増加させる物質のスクリーニング

MCAD 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼ cDNA と融合させたレポータープラスミッドを作成し、このレポータープラスミッドを細胞にトランスフェクション後、検討する候補物質を細胞に添加し、数日後に培養細胞抽出液内でのルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの活性を測定する。候補物質の添加によって、ルシフェラーゼや  $\beta$  ガラクトシダーゼの上昇が観察されれば、この物質には、MCAD 遺伝子のプロモーターを活性化させる能力がある可能性が強く示唆される。つぎに、この候補物質を培養細胞に添加し、その後 MCAD 遺伝子の mRNA の発現量の増加をノーザンブロット法や定量的 RT-PCR 法等で評価する。同様に培養細胞を用いて MCAD タンパク質の発現量の増加を抗 MCAD 抗体を用いたウエスタンブロット法で評価する。あるいは、前記(B)の方法と同様に、非ヒト動物における MCAD mRNA 量や MCAD タンパク質量の増加を評価してもよい。

なお、前記の各方法において使用する遺伝子組換え技術（組換え DNA 技術）については、例えば J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座 1、遺伝子研究法 II」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、

「新生化学実験講座 2、核酸 III（組換え DNA 技術）」、東京化学同人 (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) & 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, New York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, New York (1991); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, New York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, New York (1999); J. C. Glorioso et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306, Academic Press, New York (1999)などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる。

また、前記(A)の方法で使用する抗ERRL1抗体、および前記(B)および(D)の方法で使用する抗MCAD抗体は、それぞれERRL1タンパク質およびMCADタンパク質を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、それぞれのタンパク質のエピトープに結合することができる全体分子、およびFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv断片等が全て含まれる。このような抗体は、精製ERRL1タンパク質やMCADタンパク質、またはその部分ペプチドを抗原として用いて動物を免疫した後、血清から得ることができる。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取したB細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、モノクローナル抗体を産生することができる。このような抗体の調製は文献（新生化学実験講座12、分子免疫学、Ⅲ抗原・抗体・補体、南江堂、1992年；「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣川書店、1990年；"Monoclonal Antibody" James W. Goding,

third edition, Academic Press, 1996等)に記載の公知の方法によって行うことができる。さらに、このような抗体を用いた測定方法については、例えば、入江 寛編,「ラジオイムノアッセイ」,講談社,昭和49年発行;入江 寛編,「続ラジオイムノアッセイ」,講談社,昭和54年発行;石川栄治ら編,「酵素免疫測定法」,医学書院,昭和53年発行;石川栄治ら編,「酵素免疫測定法」(第2版),医学書院,昭和57年発行;石川栄治ら編,「酵素免疫測定法」(第3版),医学書院,昭和62年発行;H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989); M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990); J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991)など、あるいはそこで引用された文献を参考に実施することができる。



さらにまた、前記(A)、(B)および(D)の方法において非ヒト動物個体を対象としてスクリーニングを行う場合には、この発明によって提供されるトランスジェニック非ヒト動物を正の対照とすることができる。すなわちこの発明のこのトランスジェニック非ヒト動物は ERRL1 タンパク質を過剰発現し、その結果として受容体 ERR および MCAD 遺伝子を高度に発現して抗肥満および抗糖尿病特性を示す。従って、このトランスジェニック動物細胞の遺伝子発現をコントロールとして候補物質の個体内作用を判定することができる。

この発明のトランスジェニック非ヒト動物は、公知のトランスジェニック動物作製法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77;7380-7384, 1980）に従って作成することができる。すなわち、前記のマウス ERRL1 ポリヌクレオチドまたはヒト ERRL1（ヒト PERC）ポリヌクレオチド（以下、「導入遺伝子」と記載することがある）を非ヒト動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としてはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ等の実験動物として利用されている動物を対象とすることができるが、近交系が確立しているマウスの使用が好ましい。また、導入遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。このプロモーター／エンハンサー配列の選択によって、ERRL1 タンパク質を全身性に発現させることもでき、また特定の組織で選択的に発現させることもできる。このような導入遺伝子は、前記のポリヌクレオチドやプロモーター／エンハンサー配列を、導入遺伝子の発現調節に有効な位置関係となるように環状 DNA ベクターに挿入連結することによって構築することができる。そして、このベクターDNA を制限酵素で切断した後、ベクター部分を除去したものを全能性細胞に導入する。遺伝子を導入する全能性細胞としては、受精卵、や初期胚、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いることができる。また全能性細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック動物個体の産出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNA の物理的注入（マイクロインジェクション）法が最適である。遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（例えば、尾部先端）から DNA を抽出し、

サザン解析や PCR 法により導入遺伝子の存在を確認する。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代 (Founder) とすれば、導入遺伝子はその子 (F1) の 50% に伝達される。さらに、この F1 個体を野生型動物または他の F1 動物と交配させることにより、2 倍体染色体の片方 (ヘテロ接合) または両方 (ホモ接合) に導入遺伝子を有する個体 (F2) を作成することができる。このようにして作出されたトランスジェニック動物は、全ての体細胞または特定の組織において ERRL1 タンパク質を過剰発現し、後記実施例に示したように摂食亢進性でありながら痩身であり、またエネルギー消費が顕著に高いというユニークな特徴を有している。このようなトランスジェニック動物は、前記のスクリーニング方法におけるコントロールとしてばかりか、抗肥満や抗糖尿病の全身レベルでのメカニズムの解明にとっても有用なモデル動物である。

この出願の発明はさらに、前記のスクリーニング方法によって特定された 1 以上の物質を有効成分として含有する新規の肥満治療薬および/または糖尿病治療薬を提供する。すなわち、この薬剤は、第 1 には ERRL1 発現を増加させる作用、第 2 には ERR の転写活性を増加させる作用、第 3 には ERRL1 と ERR の間の相互作用を増加させる作用、第 4 には MCAD 遺伝子産物の発現量を増加させる作用の少なくとも 1 以上を有するものである。

この発明の治療薬は、前記の有効物質と、薬理学的に許容しうる担体とを均一に混合して製剤化することができる。担体は、薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜に選択することができるが、この発明の薬剤は、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあることが望ましい。懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール類の賦形剤、デンプン、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可

塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤およびカプセル剤は、投与が容易であるという点において、この発明の製剤における好ましい単位投与形態である。錠剤やカプセルを製造する際には、固体の製薬担体が用いられる。また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 1. 方法

#### 1.1. データベース探索

EST 相同性探索は、BLAST プログラム (Altshul, S.F. et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) を使用して行った。

#### 1.2. RNA 分析

文献 (Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 7.2-7.87, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) の記載に従ってノーザン・プロット分析を行った。MCAD (Genbank accession No. U07159) の cDNA プローブ、PRC (BC013720)、ERR1 (U85259)、ERR2 (S82458)、ERR3 (AF117254)、ACC2 (AF290178)、および UCP-3 (AF032902) は RT-PCR によって得た。

#### 1.3. 転写活性分析

トランスフェクションおよびレポーター分析は、文献 (Takada, I. et al., Mol. Endocrinol. 14:733-740, 2000) の記載に従って行った。すなわち、

GAL4 結合配列の 4 コピーを含むレポーター遺伝子 ((UAS)<sub>4</sub>-Luc) を、GAL4 の DNA 結合領域と核内受容体のリガンド結合領域を融合したキメラ受容体の発現ベクター (pCMX-GAL4-核内受容体) の存在または非存在下で CV-1 細胞にトランスフェクションして、GAL4-核内受容体融合タンパク質の転写活性を測定した (Takada, I. et al., Mol. Endocrinol. 14:733-740, 2000)。すべてのルシフェラーゼ活性を共トランスフェクトされた  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性によって正常化した。次に述べる核内受容体のリガンド結合ドメインに融合した GAL4 のアミノ酸 1-147 が使用された。マウス AR (アミノ酸 607-899, Genbank accession 番号 X59592)、ヒト ER $\alpha$  (a.a. 251-595, X03635)、ヒト GR (a.a. 489-777, M10901)、ラット FXR (a.a. 190-469, U18374)、ヒト RAR $\alpha$  (a.a. 126-432, X06538)、ヒト RXR $\alpha$  (a.a. 222-462, X52773)、マウス PPAR $\alpha$  (a.a. 156-468, X57638)、ヒト PPAR $\gamma$  1 (a.a. 176-478, L40904)、ヒト PXR (a.a. 110-434, AF084645)、ヒト ERR1 (a.a. 147-422, L38487)、ヒト ERR2 (a.a. 171-433, X51417)、ヒト ERR3 (a.a. 173-436, AF058291)、ヒト HNF4 $\alpha$  (a.a. 125-465, X76930)、ヒト NOR (a.a. 361-626, D78579)、ヒト NURR1 (a.a. 264-535, S77154)、ヒト ROR $\alpha$  1 (a.a. 140-523, U04897)、ヒト SF1 (a.a. 64-461, U76388)、ヒト COUP (a.a. 156-423, X12795)、ヒト TR2-11 (a.a. 149-603, M29960)、ヒト RevErbA (a.a. 199-614, M24898)。なお、それぞれの核内受容体の省略名称は Genbank ファイルを参照している (Giguere, V., Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。GAL4-核内受容体の発現プラスミドは、K. Umesono 博士から供与された。マウス PGC-1 cDNA は、マウスの胎児 cDNA ライブラリーをスクリーニングして得た。ヒト ERR1、2、3 の完全長の cDNA は、RT/PCR によって得た。増幅産物を pCAGGS および pCMX 発現ベクター中にサブクローニングし、シーケンシングによって確認した。

#### 1.4. タンパク質相互作用分析

ERR1 および ERR3 を GST とを融合したコンストラクト (発現ベクター) を、文献 (Kamei, Y. et al., Cell 85:403-414, 1996) の記載に従い、<sup>35</sup>S-ERRL1 (TNT、プロメガ) と共にインキュベートした後、洗浄し、結合した <sup>35</sup>S-

ERRL1 を SDS-PAGE で分離後、オートラジオグラフィーで定量した。

### 1.5. 安定細胞系

フェニックス 293 細胞 (University of Stanford、G.P. Nolan 博士から贈  
5 呈) を使用してレトロウイルスをパッケージングした (Grignani, F. et al.,  
Cancer Res. 58:14-19, 1998)。ERR1、ERR3 および GFP (コントロール)  
の cDNA を含む pLNCX 由来の発現プラスミド (Clontech) および ERRL1、  
PGC-1 または GFP の cDNA を含む pMX 由来の発現プラスミド (Misawa, K.  
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3062-3066, 2000) は、メーカーの指  
10 示書に従って使用した。

### 1.6. トランスジェニックマウスの作出

pCAGGS (Niwa, H., Gene 108:193-200, 1991) に ERRL1 cDNA をクロー  
ニングし、トランスジーン (図 4a) を切り取り、精製した ( $2\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ )。  
15 BDF1 オスとかけ合わされた BDF1 メス (C57BL/6xDBA/2) から受精卵を回  
収し、標準法 (Gordon, J., in Guide to Techniques in Mouse Development,  
(eds Wassarman, P.M. & DePamphilis, M.L., 747-771, Academic press,  
San Diego, 1993)によりトランスジーンを微量注入した。マウスの世話は発明  
者が属する施設のガイドラインに従って行った。

20

### 1.7. 高脂肪食

常用食 (Oriental Yeast Inc., 東京、日本) あるいはカゼイン (20%  
wt/wt)、 $\alpha$  コーンスターチ (30.2%)、蔗糖 (10%)、ラード (25%)、コ  
ーン油 (5%)、ミネラル (3.5%)、ビタミン (1%)、セルロース粉 (5%) お  
よび D、L メチオニン (0.3%) を含む高脂食 (Aoki, N. et al., Obesity Res.  
25 1:126-131, 1993) をマウスに与えた。

### 1.8. エネルギー消費の測定

酸素消費および二酸化炭素の生成を、質量分析器上とコンピューターからなる  
30 間接カロリーメータシステムを使用して決定した (Komenani, N. et al., J.

Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 41:395-407, 1995)。マウスを、それぞれガスマススペクトロメーター (WSMR-1400、Westron、千葉、日本) に繋がれた開放回路型プラスチック呼吸実験箱 (24×46×18 cm) に入れた。気流は 2 l/min で制御した。ガス分析は 10:00 から次の日の 9:00 まで実施した。サンプル  
5 を、部屋の空気を基準として、2 分毎に続けてモニターした。移動活動は、各呼吸器の下に設置された Animex-III (Shimadzu、京都、日本) によって 10 分ごとに自動的に記録した。エネルギー消費は文献 (Komenani, N. et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 41:395-407, 1995) の記載に従って計算した。

## 10 1.9. KKAY マウス

KKAY マウスは、Clea Japan Inc. (東京) から購入した。

### 1.10. 統計学的分析

二つの実験グループから入手したデータの統計学的比較は、スチューデント t  
15 -検定を使用して行った。多数のグループからのデータは、一方向分散分析 (ANOVA) によって比較し、各グループとその他のグループとの比較は、フィッシャーの制約付最小有意差 (PLSD) 検定 (Statview 4.0、Abacus Concepts) で行った。P<0.05 または P<0.01 を統計学的有意差とした。

20

## 2. 結果

### 2.1. ERRL1 cDNA のクローニングとその特徴

PGC-1 関連分子について EST (expression sequence tags) を探索した結果、  
25 PGC-1 と極めて高い相同性を有する EST を見出し、この EST を含む完全長 cDNA を単離した。この cDNA は、約 3.4kb からなり (配列番号 1)、1,014 個のアミノ酸配列 (配列番号 2) からなるタンパク質をコードしている。このタンパク質は、ERR の「タンパク質リガンド」としての特質 (後で詳述する) をもとに ERRL1 (ERR ligand 1 の略) と命名した。なお、Lin らは PGC-1β と  
30 呼ばれる PGC-1 相同体のクローニングを報告しているが (Lin, J. et al., J.

Biol. Chem. 277:1645-1648, 2002)、この PGC-1 $\beta$  は、ERRL1 と唯一アミノ酸が異なっている (配列番号 2 の 260 番目 Leu が、PGC-1 $\beta$  では Pro) 。 ERRL1 および PGC-1 は、ERRL1 の中央にみられる特有の領域を除いては、高度のアミノ酸同一性を示した。相同領域は、配列同一性および推定される機能的

5 特質に基づいて 5 つのドメインに分けられた (図 1) 。ERRL1 の N 末端領域 (アミノ酸 1-282) は、二つの LXXLL モチーフ、すなわち核内受容体に対して結合すると思われるモチーフ (Torchia, J. et al., Nature 387:677-684, 1997; Heery, D.M., et al., Nature 387:733-736, 1997) を含み、PGC-1 と 41% の同一性を持つ。第二番目の領域 (アミノ酸 283-579) は、ERRL1 に特有

10 で、E (グルタミン酸) 繰り返しを含み、LXXLL モチーフを一つ含む。第三番目の領域 (アミノ酸 580 - 656) は高度に保存 (47% のアミノ酸同一性) されている。第四番目の領域 (アミノ酸 657 - 882) は保存性が低く (22% のアミノ酸同一性)、PGC-1 中の長い SR ドメインと比較すると非常に短いセリン - アルギニン (SR) に富むドメイン (Tacke, R. & Manley, J.L. Curr. Opin. Cell

15 Biol. 11:358-362, 1999) を ERRL1 中に含んでいる。C 末端ドメイン (アミノ酸 883 - 1014) は、推定される RNA 結合ドメイン (Krecic, A.M. & Swanson, M.S., Curr. Opin. Cell Biol. 11:363-371, 1999) を持ち、高度に保存されている (52% アミノ酸同一性) 。

## 20 2.2. ERRL1 および ERR 間の類似発現パターン

成熟マウスの異なる組織における ERRL1 の発現パターンを調べた。長さ約 10kb および 4kb の二つの ERRL1 mRNA を観察した。ERRL1 mRNA は、脳、BAT、心臓、骨格筋に豊富に存在しており、また腎臓、胃、白色脂肪組織 (WAT) においても検出された。先の報告 (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-

25 839, 1998) と一致して、寒冷ストレスに曝した後、PGC-1 発現がマウスの BAT で上昇したが、ERRL1 mRNA はこのストレスによってほんのわずかに発現増加するのみであった。

さらにまた、ERRL1 の発現パターンは、ERR1 の発現パターンと非常によく類似しており (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997 およ

30 び図 2) 、つまり、両 mRNA は、細胞エネルギーの源である脂質を利用できる

組織、例えば BAT、心臓、骨格筋および腎臓で高度に発現されている（図 2A）。なお、ERR2 mRNA の発現は検出されなかったが、これは以前の研究報告（Giguere, V. et al., *Nature* 331:91-94, 1988）と一致している。

次に、3T3 - L1 細胞が脂肪細胞へ分化する間に ERRL1 発現が増加するかどうかを調べた。確かに、ERRL1 mRNA は 3T3 - L1 前脂肪細胞中では非常に低レベルで存在しており、脂肪細胞分化中に著しく増加した。これに対して、PGC-1 および別の PGC-1 関連分子である PRC（Andersson, U. & Scarpulla, R.C. *Mol. Cell. Biol.* 21:3738-3749, 2001）の mRNA は、この脂肪細胞分化中においては低レベルのままであった（図 2B）。ERRL1 mRNA が同様に増加することが、別の前脂肪細胞株の 10T1/2 から分化した成熟脂肪細胞（Smas, C.M. & Sul, H.S. *Biochem. J.* 309:697-710, 1995）においても観測された（図 2C）。また、ERR1 およびそのターゲットである MCAD の発現の様子が ERRL1 と非常に類似していたが（図 2B、C）、ERR2 mRNA および ERR3 mRNA の発現は、それらの細胞では検出されなかった。これらの結果から、ERRL1 は脂質代謝等の成熟脂肪細胞関連機能における遺伝子調節に関与することが示唆される。

### 2.3. 汎核内受容体アゴニストとしての PGC-1

ERRL1 が PPAR $\gamma$  の共活性因子として機能できるかどうかを、PGC-1 を共活性因子のコントロールとして調べた。予想に反して、ERRL1 が PPAR $\gamma$  によって媒介される転写を活性化できることを示す証拠を見つけることができなかった。対照実験において、脂溶性リガンドを外部から加えなくても、PGC-1 が単純に発現することによって PPAR $\gamma$  により媒介される転写が劇的に活性化されることが確認された。PGC-1 は、PPAR $\gamma$  ばかりでなく、数種の他の核内受容体とも物理的に相互作用することが知られている（Puigserver, P. et al., *Cell* 92:829-839, 1998; Yoon, J.C. et al., *Nature* 413:131-138, 2001; Tcherepanova, I. et al., *J. Biol. Chem.* 275:16302-16308, 2000; Vega, R.B. et al., *Mol. Cell. Biol.* 20:1868-1876, 2000; Delerive, P. et al., *J. Biol. Chem.* 277:3913-3917, 2002）。更に、冷氣に曝されたり（Puigserver, P. et al., *Cell* 92:829-839, 1998）、絶食（Yoon, J.C. et al., *Nature* 413:131-138, 2001）



Lehman, J.J. et al., J. Clin. Invest. 106:847-856, 2000) 状態下等の特定の環境的变化により PGC-1 が誘導される事がわかっている。このような観察知見により、PGC-1 の単なる発現が多くの核内受容体の経路を活性化する可能性があることが高まった。予想されるこのような特徴は、核内受容体の古典的な脂溶性リガンドに類似している。そこで、このような可能性の検証に取り組むために、その DNA 結合ドメインを GAL4 DNA 結合ドメインに置き換えた核内受容体を使用した。この置き換えによって、複数の核内受容体の転写活性の様相を、(UAS)<sub>4</sub>-Luc 等の同一のレポーター (遺伝子) で簡単に比較することができる。実際、PGC-1 は、orphan HNF4 $\alpha$ 、SF1、ERR を含む多数の核内受容体を介して転写を活性化することができた。中でも PGC-1 は HNF4 $\alpha$  をもっとも強力に活性化できた。これは最近の報告 (Yoon, J.C. et al., Nature 413:131-138, 2001) と一致する。PGC-1 は続いて、ER $\alpha$ 、SF1、ERR、PPAR、PXR、RAR $\alpha$  および RXR $\alpha$  を活性化した (図 3A)。これらの観察知見により、PGC-1 は、汎用または広範な核内受容体アゴニストとして機能することが確認された。

15

#### 2.4. ERR タンパク質のリガンドとしての ERRL1

前記と同じ GAL4 融合核内受容体セットを使用して、ERRL1 の潜在パートナーを探索し、ERR に媒介される転写を ERRL1 が特異的に活性化できることを見出した。ERR3 は、ERRL1 によって最も強力に活性化され、その次に ERR1 20 そして ERR2 が活性化された (図 3B)。そこで、完全長の ERR に対する ERRL1 の転写活性化特性についてテストした。上記実験と一致して、ERRL1 は投与量に依存して、MCAD 遺伝子プロモーター (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P. J. Biol. Chem. 272:31693-31699, 1997) の ERR 応答性配列 (ERRE) を経て行われる完全 25 長 ERR3 および完全長 ERR1 に媒介される転写を活性化した (図 3C)。前者は後者と比べてはるかに強く活性化された。

次に ERRL1 が物理的に ERR と相互作用するかどうかを、細菌を使って生成したグルタチオン S トランスフェラーゼ融合 ERR (GST-ERR) とインビトロで翻訳された ERRL1 を用いたインビトロ結合分析によってテストした。GST 単 30 独ではなくマトリックスに結合した GST-ERR1 および GST-ERR3 は、放射性

標識された ERRL1 を有効に保持した (図 3D)。また、先の報告 (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P. J. Biol. Chem. 272:31693-31699, 1997) と同様に、ERR が放射性標識された MCAD ERRE オリゴヌクレオチドと結合したことをゲル移動度シフト分析で確認し、また ERR-DNA 複合体が ERRL1 タンパク質を添加したことによってスーパーシフトしたことを確認した。脂溶性ホルモンは、タンパク質合成と結合反応のどちらにおいても何も加えていないことから、これらの結果より ERRL1 および ERR が直接 ERR のターゲットプロモーター DNA と相互作用できることが示唆された。

- 次に、10T1/2 細胞株において ERRL1 および ERR を発現させ、ERRL1 が MCAD 遺伝子発現を ERR を介して活性化するかどうかについて調べた。GFP (コントロール)、ERR1、ERR3、ERRL1 または PGC-1 をコードする DNA を含んでいる組換えレトロウイルスを組み合わせて 10T1/2 細胞に感染させた。ノーザン・ブロット分析を行い、各細胞で導入された遺伝子の発現を確認した (図 3e)。ERR1 または ERR3 のいずれかが単独に発現すると、GFP 単独を感染させた細胞における発現と較べて、MCAD mRNA レベルは中程度に増加した。ERR1 と ERRL1 の両者または ERR3 と ERRL1 の両者を共に発現させると、MCAD mRNA レベルはさらに顕著に増加した (図 3E)。これらの結果をまとめると、ERRL1 は ERR の「タンパク質リガンド」として機能し、少なくとも培養細胞中では、ERR に媒介される転写を活性化させる事が確認された。

## 2.5. ERRL1 マウスの作成

上昇した ERRL1 発現の影響を *in vivo* で調べるため、ERRL1 トランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスは活性化された ERR 媒介転写によって誘導されるマウスの表現型に類似したものとなると予想される。サイトメガロウイルス極初期エンハンサーを持つチキン  $\beta$  アクチン・プロモーター (CAG プロモーター) を使用し、マウス個体内でのマウス ERRL1 導入遺伝子の発現を促した (図 4A)。マウスの尾部 (tail) DNA のサウザン・ブロット分析を行い、導入遺伝子のコピー数を決定した (図 4B)。

- ERRL1 導入遺伝子の発現を、ERRL1 マウスおよびコントロールの 8 週齢、

同腹のマウスの組織から単離された RNA についてノーザン・ブロット分析を行って評価した（図 4C）。導入遺伝子特異的プローブ（プローブ 2、図 4A）を使用した場合、4kb の単一バンドのみが検出された。CAG プロモータは、どの組織中でも強活性を示したと報告されている（Niwa, H. et al., Gene 108:193-200, 1991）。しかしながら意外にも、このプロモーターを使用した結果、脳、BAT、心臓、骨格筋、および睾丸等のいくつかの限られた組織中で ERRL1 導入遺伝子の高い発現レベルが観察されたが、肝臓では非常に低い発現しか観察されなかった（図 4C）。これらの発現プロファイルは、内在性 ERRL1 発現パターンと比較的良好に一致していた（図 4C）。この観察知見は、ERRL1 発現に極めて重要な組織特異的調整 cis 配列が、このコンストラクト中の ERRL1 cDNA 中に存在している可能性を示唆している。

in vitro のデータから予測されるように、ERRL1 マウスの骨格筋での ERRL1 発現の上昇（図 4D）が、in vivo での MCAD mRNA 発現を上昇させた。これに対して ERRL1 の発現の上昇は、アセチル CoA カルボキシラーゼ 2 (ACC2) (Abu-Elheiga, L. et al., Science 291:2613-2616, 2001) および脱共役タンパク質 3 (UCP3) (Clapham, J.C. et al., Nature 406:415-418, 2000) 遺伝子の発現には影響しなかった。

## 2.6. ERRL1 マウスは摂食亢進性であるが痩身である

ERRL1 マウスに見られた明白な表現型は痩せであった。これは脂肪酸の  $\beta$  酸化の増加から予測できるものとよく一致していた。この表現型は、マウスを高脂肪食 (Aoki, N. et al., Obesity Res. 1:126-131, 1993) で飼育した時にもっと顕著であった。9 週齢目の野生型コントロールマウス (雄、n=6) および ERRL1 マウス (雄、n=6) に高脂肪食を自由に与え、毎週、各マウスの食糧消費量および体重を測定した。ERRL1 マウスはコントロールマウスよりも有意に多くの食糧を消費した（図 5A）。しかしながら、トランスジェニックマウスの体重は、コントロールマウスよりも高脂肪食による飼育前および飼育期間中には 15 から 25% 少なく（図 5B）、脂肪組織中には少ししか脂肪が蓄積されていなかった（図 5C）。ERRL1 マウス中の精巣上体の WAT は  $0.92 \pm 0.28$ g であった。これと比べてコントロールマウスは  $2.0 \pm 0.30$ g であった（図 5D および表

1) 。これに対して、肝臓の重さは、著しく違うことはなかった (ERRL1 マウス :  $1.23 \pm 0.06$  g、コントロールマウス :  $1.4 \pm 0.08$  g) 。トランスジェニックマウスの脂肪細胞はコントロールマウスより小さかった (ERRL1 マウスの脂肪細胞の平均直径 :  $25.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 、コントロールマウス :  $54.5 \pm 2.2 \mu\text{m}$ 、図 5E、5 F) 。

それらマウスの血液を採集し、血清成分を生化学的に分析した (表 1) 。脂肪質量の低下は、結果として血清中のレプチンの量の低下を招いた (ERRL1 マウス :  $5.9 \pm 3.5 \text{ ng ml}^{-1}$ 、コントロールマウス :  $25.0 \pm 6.6 \text{ ng ml}^{-1}$ ) 。レプチンは、WAT から分泌される抗食欲ホルモンであるため (Friedman, J.M. Nature 404:632-634, 2000) 、ERRL1 マウスで観察されたレプチンの低下レベルはそれらが摂食亢進性であるという観測と一致している。さらに、高脂肪食を与えたコントロールマウスと比べるとトランスジェニックマウスではインシュリンのレベル低下が観察された。高脂肪食を与えた場合、マウスは、たとえ血漿インシュリンが高い濃度であっても通常ブドウ糖の取りこみに抵抗する状態になる (Li, B. et al., Nat. Med. 6:1115-1120, 2000) 。つまりインシュリン抵抗性と呼ばれる同様の状態は、肥満または 2 型糖尿病患者によく見られる (Lovejoy, J.C. Curr. Atheroscler. Rep. 1:215-220, 1999) 。ERRL1 マウスにおいて観察された体重低下およびインシュリンレベルの低下は、ERRL1 の発現増加が肥満に抵抗でき、またインシュリン抵抗性を克服することによってたとえ高カロリー食をとったとしても、糖尿病状態の改善に貢献できるということを示している。

## 2.7. ERRL1 マウスのエネルギー消費の増加

ERRL1 マウスにおけるエネルギー消費を調べた。それぞれマウスが入った呼吸分析用の試験槽でガス分析を行い、エネルギー消費を計算した。その結果、12 週齢の ERRL1 マウスのエネルギー消費は、コントロールマウスよりも顕著に高いことが確認された (休息時エネルギー消費 : ERRL1 マウス :  $126.3 \pm 3.8$ 、コントロールマウス :  $101.5 \pm 6.7 \text{ kcal day}^{-1} \text{ kg}^{-0.75}$ ,  $P < 0.05$ , 各グループにつき  $n=6$ 、全エネルギー消費 : ERRL1 マウス :  $211.2 \pm 10.7$ 、コントロールマウス :  $155.9 \pm 7.8 \text{ kcal day}^{-1} \text{ kg}^{-0.75}$ ,  $P < 0.01$ , 各グループにつき  $n=6$ ) (図 5G、5 H) 。しかしながら、移動活動は著しく変化することはなかった (ERRL1 マウ

ス：7,338±700 カウント、コントロールマウス：5,338±390 カウント、データは、24 時間にわたるすべての移動の計を示す）。これらの結果により、コントロールマウスおよび ERRL1 マウス間の体重差は、エネルギー消費の差にほぼ起因していることが確認された。

5

## 2.8. ERRL1 発現が遺伝的にプログラムされた肥満に対抗できる

ERRL1 マウスおよび KKAY マウスを交配させて、KKAY マウスの肥満表現型が ERRL1 の発現増加により抑制されるかどうかを調べた。KKAY マウスは Ay の突然変異をもっており、これによってアグーチという毛皮カラータンパク質の異所性発現を招き、優性的な遺伝性シンドロームである肥満および黄色毛皮化を引き起こす (Siracusa, L.D., Trends Genet. 10:423-428, 1994)。アグーチタンパク質は、中枢神経系において食欲の抑制性受容体として働いていると考えられているメラノコルチン受容体のアンタゴニストとして働いている (Friedman, J.M. Nature 404:632-634, 2000 ; Siracusa, L.D., Trends Genet. 10:423-428, 1994)。KKAY オスを ERRL1 メスと交配させて繁殖させ、子孫を毛皮の色 (黄色: KKAY(+), 黒: KKAY(-)) および ERRL1 トランスジェン発現によって選別した。各グループの体重を比較すると、ERRL1 トランスジェン発現は、KKAY(+)マウスにみられる体重の増加を抑制し (図 6A, B)、ERRL1 発現の増加によって、遺伝性の肥満を抑制できることが証明された。

20

## 3. 考察

以上の結果から、ERRL1 は ERR の「タンパク質リガンド」として機能し、in vivo でのエネルギー消費をコントロールしていることが確認された。すなわち、ERRL1 の発現レベルを、例えば骨格筋中で上昇させれば、これが今度は ERR タンパク質リガンドとして機能し、MCAD 遺伝子発現を活性化し、脂肪酸の  $\beta$  酸化の活性化を導くことを示している。脂肪酸の  $\beta$  酸化が亢進すると、結果として蓄積される脂肪が少なくなる。同様の効果は、ERR の転写能を活性化させること、MCAD 遺伝子発現を増加させることによっても達成されると考えられる。これらの効果は、運動を通して達成される生理的状态と極めて似通っている。

30

また以上の結果は、ERRL1 や ERR の薬理的活性化によって、通常またはそれ以上のカロリー摂取を維持したままでの体重減少が可能になることを明確に示すものである。

5

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、核内の孤児受容体 ERR とそのリガンド分子 ERRL1 との相互作用を指標として肥満や糖尿病の治療薬成分をスクリーニングする方法と、この方法によって特定された物質を有効成分とする新規薬剤が提供される。

10

## 請求の範囲

1. 肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準：
  - 5 (a)核内受容体 ERR のリガンド因子 ERRL1 の発現量を増加させる；
  - (b)核内受容体 ERR の転写活性を増加させる；
  - (c)ERRL1 と ERR の結合を促進させる；
  - (d)MCAD 遺伝子産物の発現量を増加させるのいずれか 1 以上を満たす候補物質を目的の有効成分物質として特定することを
- 10 特徴とする方法。
2. 請求項 1 の方法によって特定された 1 以上の物質を有効成分として含有する肥満および／または糖尿病の治療薬。
- 15 3. 核内受容体 ERR のリガンド因子 ERRL1 をコードする精製ポリヌクレオチドをゲノム DNA に保有し、リガンド因子 ERRL1 を過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物。

1/8

☒ 1

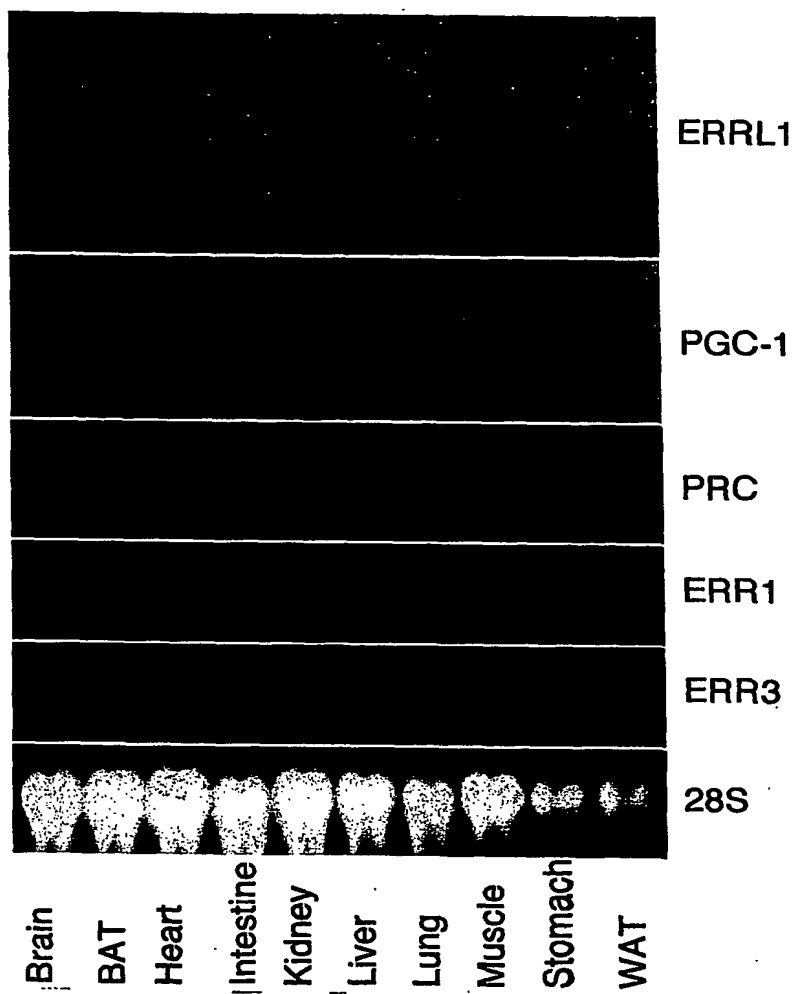
ERRL1	MAGNDCGALLDEELSSFFLNYSLDTQGGDSGEEQ-LCADLPELDLSQLDASDFDSATCFG	59
PGC-1	MAWDMCSQDSVWSDIECAALVGEDQPLCPDLPELDLSELDVNDLDTDSFLG	51
	*** ** *	
ERRL1	ELQWCPETSETEPSQYSPDDSELFQ-IDSENEA-LLAALTKTLDDIPEDDVGLAAFPELD	117
PGC-1	GLKWCSDQSEIISNQYNNEPANIFEKIDEENEANLLAVLTETLDSLPVDEGLPSFDAIT	111
	*** ** *	
ERRL1	EGDTPSCTPASAPLSAPPSPTLERLLSPASDVDELSLLQKLLLATSSPTASSDALKDGA	177
PGC-1	DGAVTTDNEASPSSM---PDGT-----PPQEAEEPSSLKLLAPANTQLSYNECSGLS	163
	* *** * *	
ERRL1	TWSQTSLS---RSQRPCVKVDGTQDKKPTTL---RAQSRPCTELHKHLTSVLP CPRVK	230
PGC-1	TQNHAANHTRIRTNPAIVKTENSWSNKAKSICQQQKQRRPCSELLKYLTTNDPPHTK	223
	* * ** *	
ERRL1	ACSPTPHPSRLLSKEE-----EEVGEDCPSW---LTPASPDQLAQTASPDQAQPF	282
PGC-1	PTENRNSSRDKCASKKKSHTQPPSQHAQAKPTTSLPLTPESPNDP---KGSPFEN---	276
	** * *** *	
ERRL1	EEDVRAMVQLIRYMHTYCLPQKLPQRAPEPIQACSSLSRQVQPRSRHPPKAFWTEFSI	342
PGC-1	-----	
ERRL1	LRELLAQDILCDVSKPYRLAIPVYASLTPQSRPRPPKDSQASPAHSAMAEVRITASPKS	402
PGC-1	-----	
ERRL1	TGPRPSLRPLRLEVKRDVNKPTRQKREDEEEEEEEEEEEEEEEEEEWGRKRPGRGLP	462
PGC-1	-----	
ERRL1	WTKLGRKMDSSVCPVRRSRRLNPELGPWLTFDTDEPLGALPSMCLDTETHNLEEDLGSILT	522
PGC-1	-----	
ERRL1	SSQGRQLPQGSQIPALESPCESGCGDTDEDPSCPQPTSRDSSRCLMLALSQSDSLGKKSF	582
PGC-1	-----KTI	279
	*	
ERRL1	EESLTVELCGTAGLTPPTTPPYKPMEEEDPFKPDTKLSPGQDTAPSLPSPEAL--PLTATP	640
PGC-1	ERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFKASPKLKPCKTVVPPPTKRARYSECSGTQ	339
	* * *** ** *	
ERRL1	GASHKLPKRHPERSEILSHLQHAT--TQVVSQAGQKRPFCSCFGDHDYQVLRPEAALQR	698
PGC-1	G-SHST-KKGPEQSEIYAQLSKSSGLSRGHEERKTKRPSLRLFGDHDYQCSLNSKTDILI	397
	* ** * ** *	
ERRL1	KV---LRSWEPGVHLEDLAQOGAPLPTETKAP---RR--EANQNCDPHKDSMQLRDHE	750
PGC-1	NISQELQDSRQLDFKDASCDWQHICSSDTSQCYLRETLEASKQVSPCSTRK--QLQDQE	456
	* ** *	
ERRL1	IRASLTKHFGLETALEGEDLASCKSPEDYTVFEDSSSS-----SGES-SFLEEEEE	802
PGC-1	IRAE LNKHFGHPCQAVF-DDKSDKTSSELRDGDFSNEQFSKLPVFINSGLAMDGLFDDSED	515
	*** * ** *	
ERRL1	EEEGGEEDDEGEDS---GVSPPCSD-HCPYQ---SPP---SKASQQLCSRSRSSSGSS	850
PGC-1	ESDKLSYPWDGTQPYSLFDVSPSCSSFNPCRDVSPPKSLFSQRPQRMRSRSPSRHR	575
	* * *** *	
ERRL1	SCS-----SWSPATRKN-----FRRESRGPCS-----DG	874
PGC-1	SCSRSPYSRSPSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHRNSPLYVRSRSPYSRRPRYDS	635
	*** * ** *	
ERRL1	TPSVRHAR-----KRRE-----KAIGEGRVVYIRNLSSDMSSRELKRR	912
PGC-1	YEAYEHERLKRDEYRKEHEKRESERAKQERERQKQKAIERRVIYVGKIRPDTTRTELDR	695
	* * ** *	
ERRL1	FEVFGIEVCQVLT	970
PGC-1	FEVFGIEIECTVNLRDD-GDSYGFITYRYTCDAFAAL--ENGYTLRRSNETDFELYFCGR	752
	***** ** *	
ERRL1	RHFRWPRYTDYDPTSEESLPSSGSKSYEAMDFDSLLKEAQQSLH	1014
PGC-1	KQFFKSNYADLDTNSDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLKEAQRSLRR	797
	* * ** *	



2/8

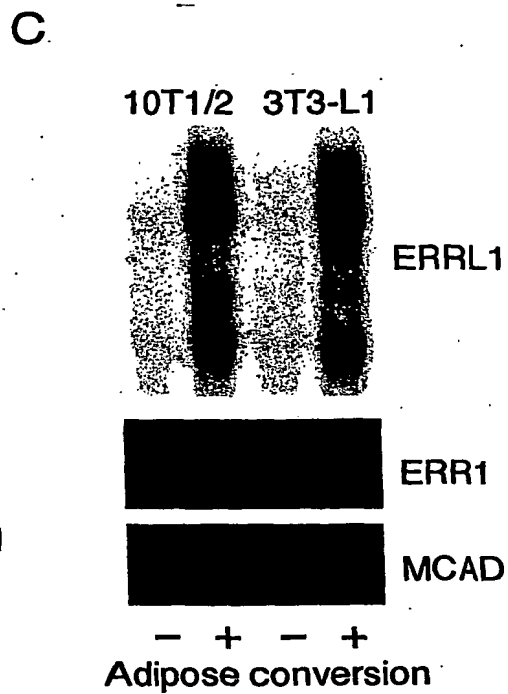
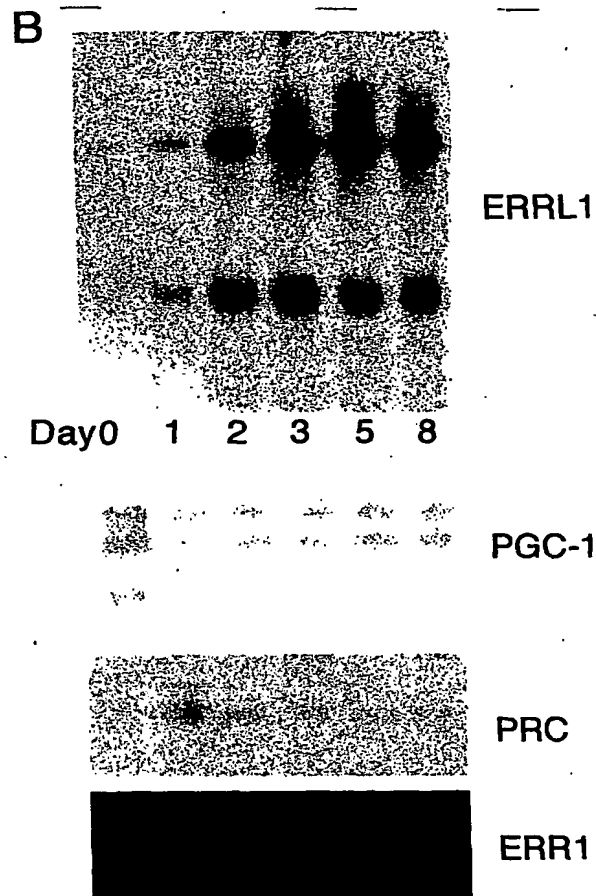
図 2

A



3/8

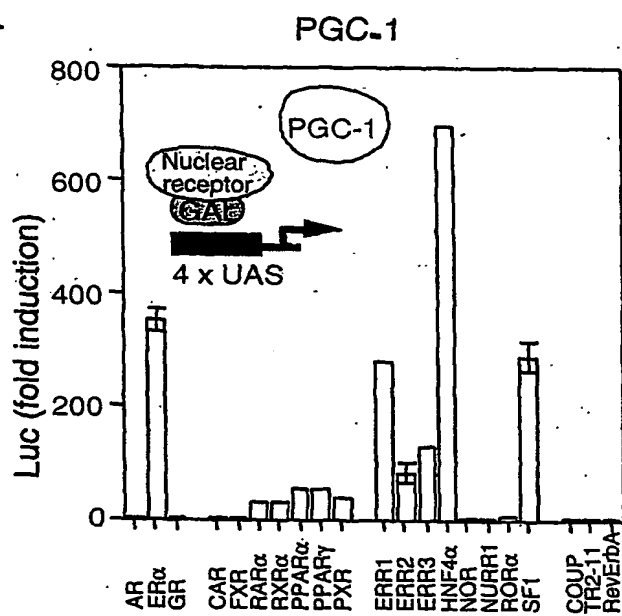
2



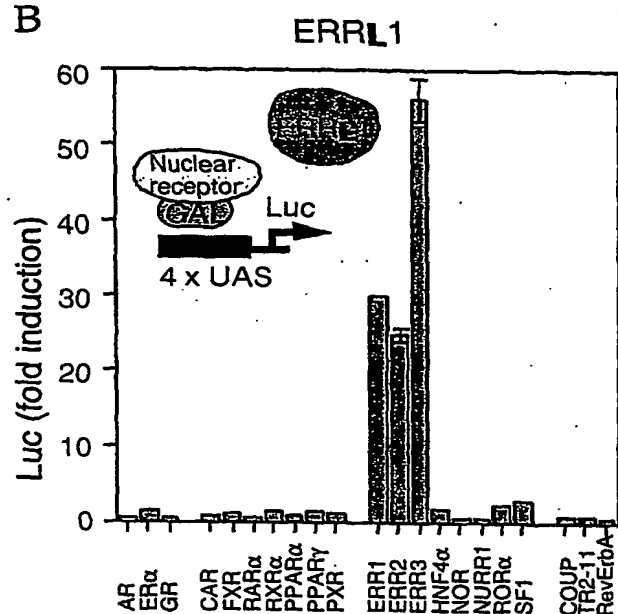
4/8

3

A

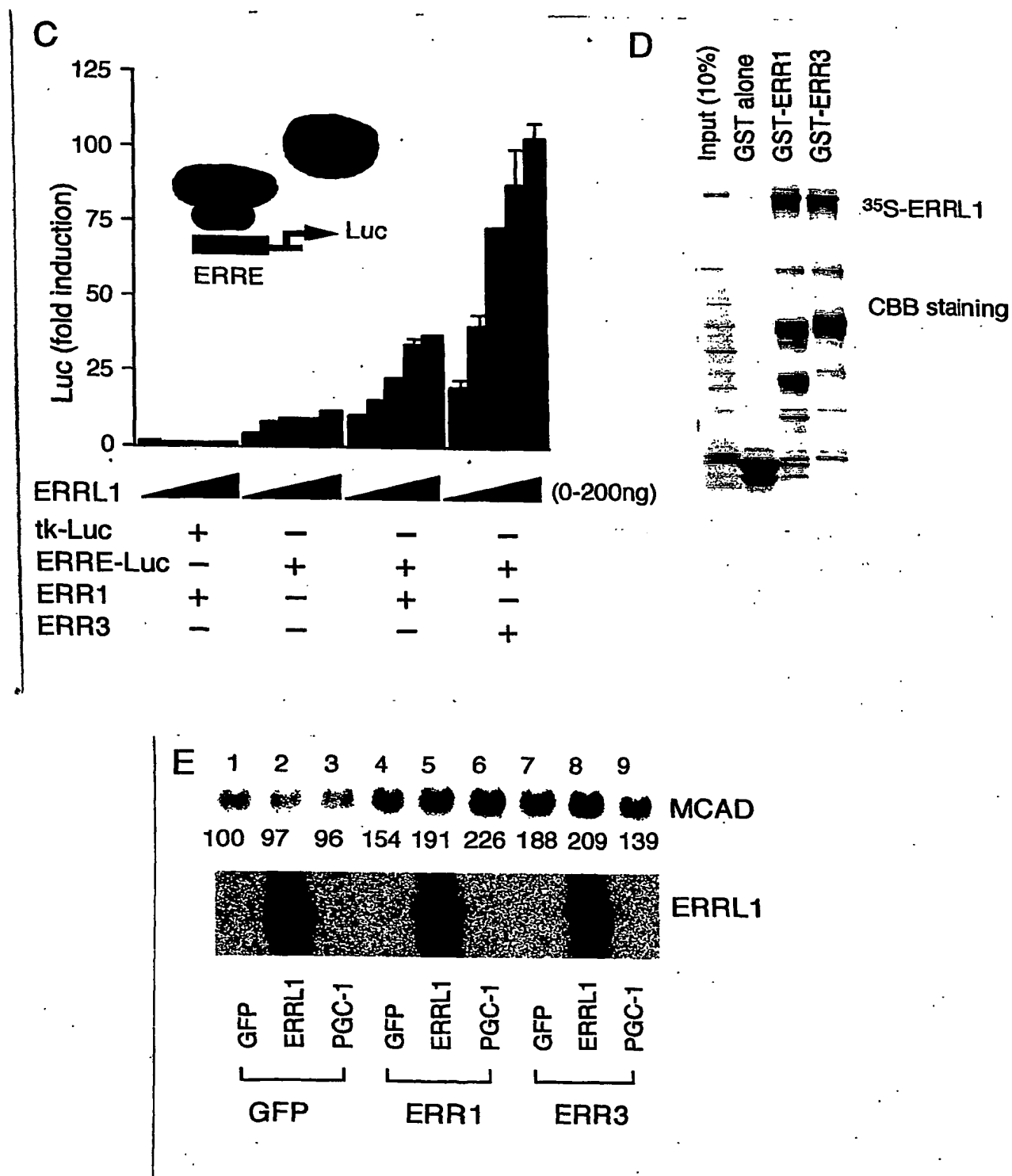


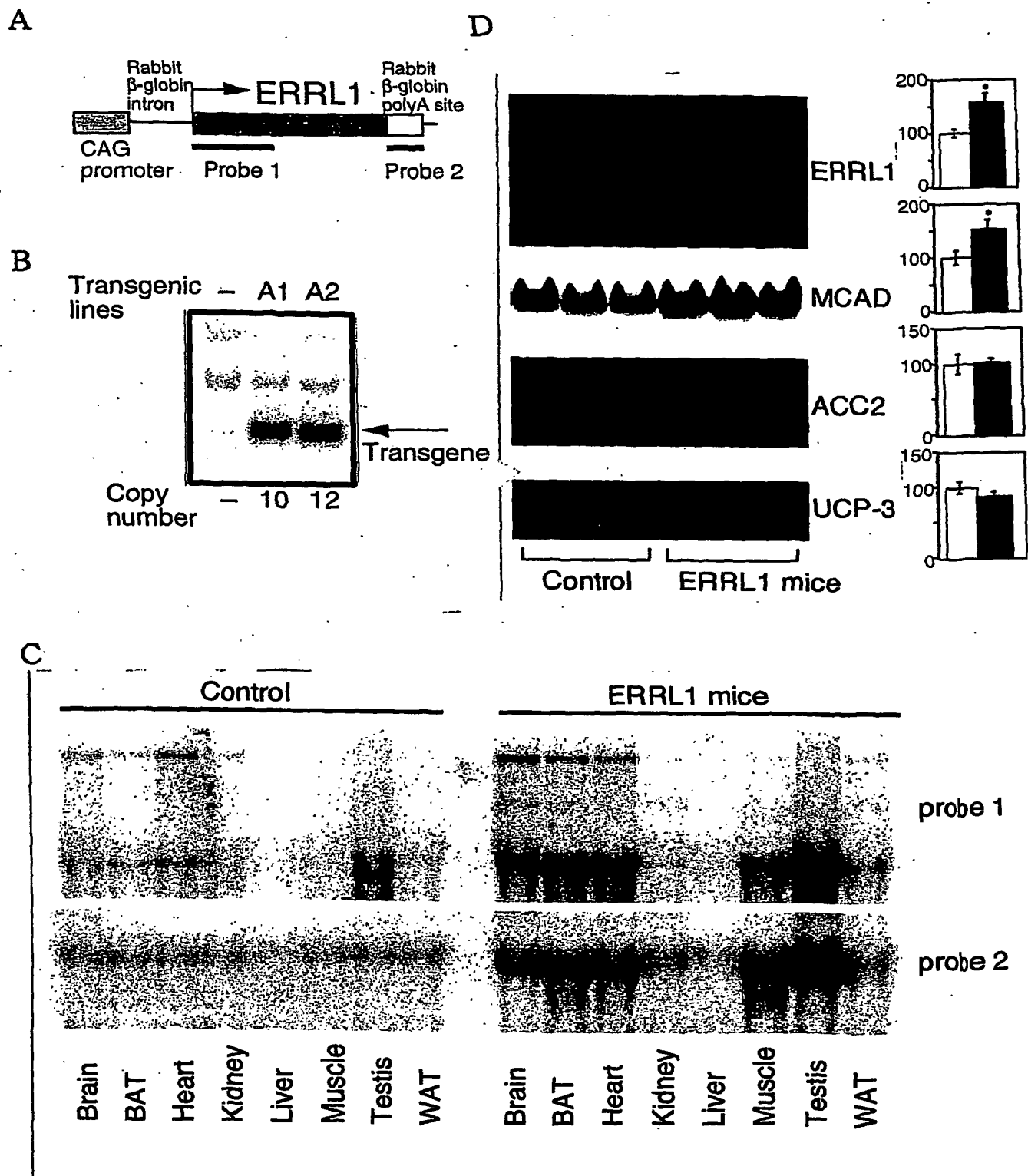
B



5/8

图 3

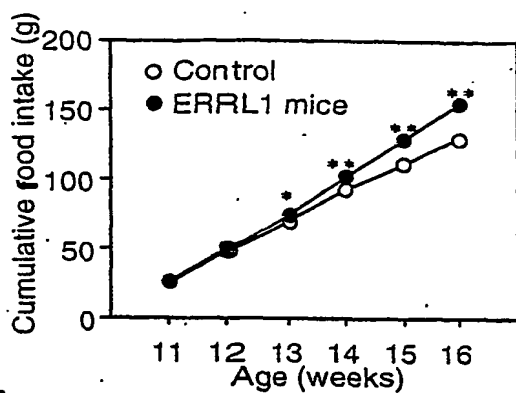


6/8  
図 4

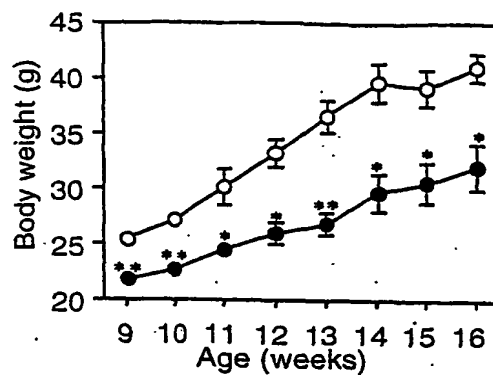
7/8

5

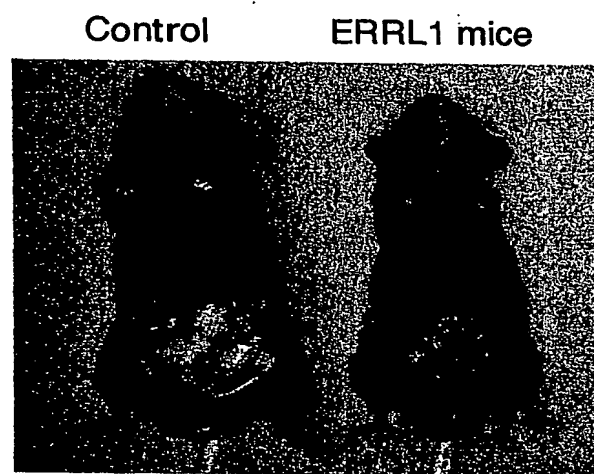
A



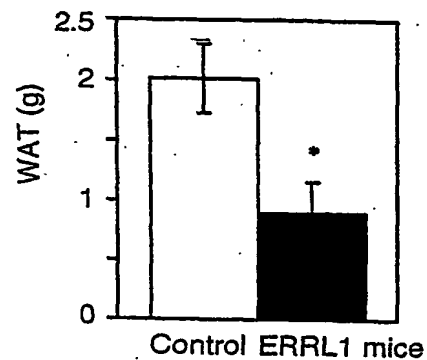
B



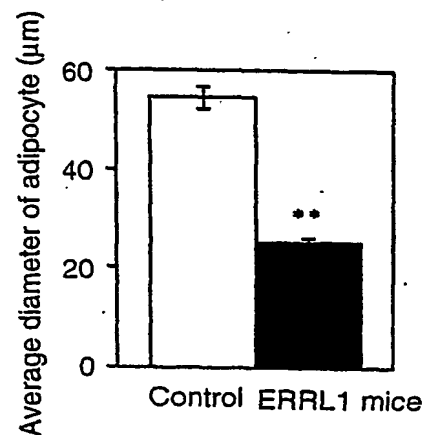
C



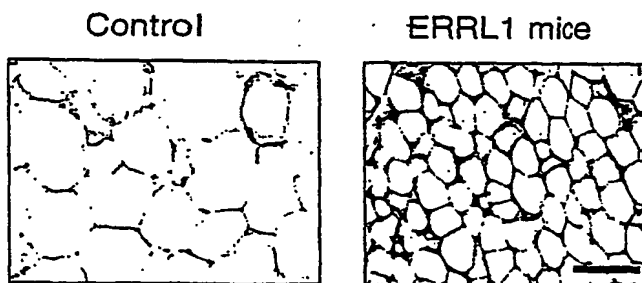
D



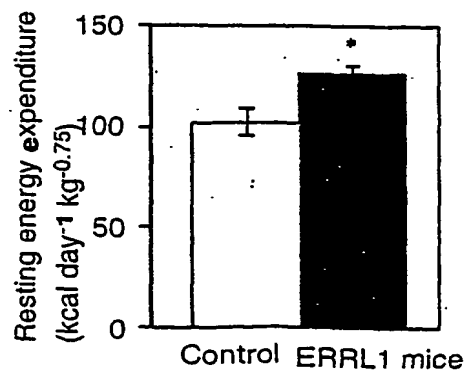
F



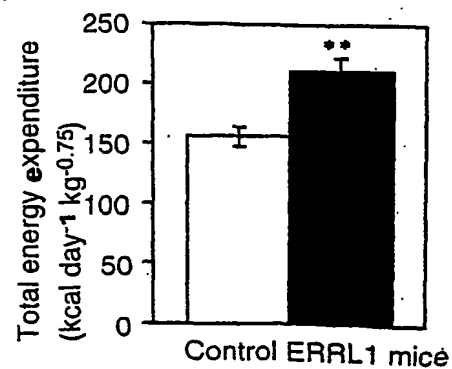
E



G



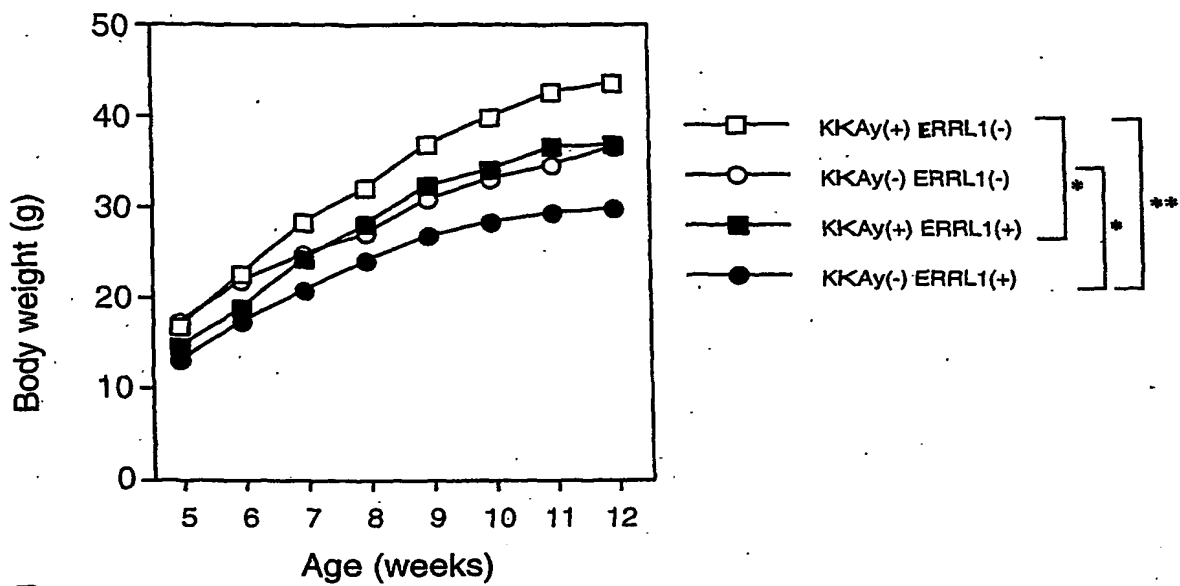
H



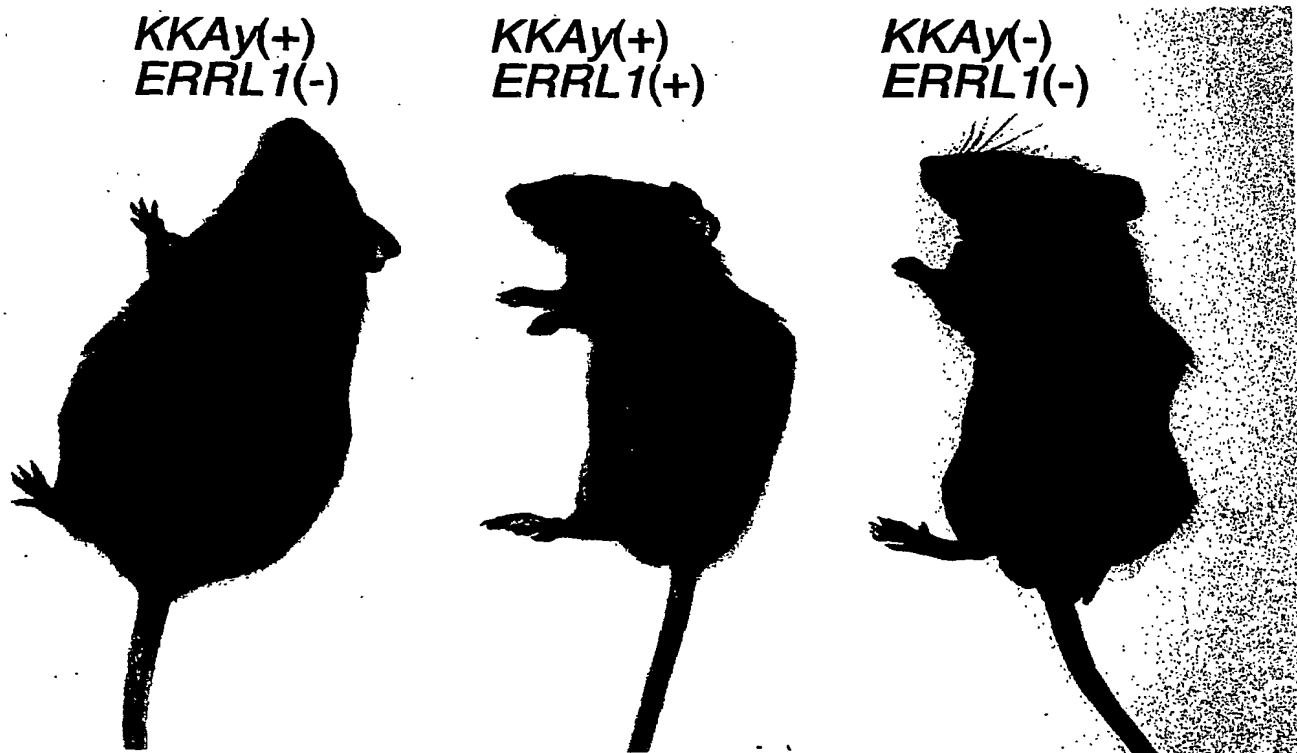
8/8

図 6

A



B



1/10

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan science and Technology Corporation

&lt;120&gt; A method of drug screening

&lt;130&gt; 03-F-039PCT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 2002-231999

&lt;151&gt; 2002-08-08

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3345

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (32).. (3076)

&lt;400&gt; 1

```

ctccgccgca cgctgcagcc gcggctggaa g atg gcg ggg aac gac tgc ggc    52
                               Met Ala Gly Asn Asp Cys Gly
                               1           5

```

```

gcg ctg ctg gat gaa gag ctc tcg tcc ttc ttc ctc aac tat ctc tct    100
Ala Leu Leu Asp Glu Glu Leu Ser Ser Phe Phe Leu Asn Tyr Leu Ser
      10           15           20

```

```

gac acg cag ggt ggg gac tct gga gag gaa cag ctg tgt gct gac ttg    148
Asp Thr Gln Gly Gly Asp Ser Gly Glu Glu Gln Leu Cys Ala Asp Leu
      25           30           35

```

```

cca gag ctt gac ctc tcc cag ctg gac gcc agt gac ttt gac tca gcc    196
Pro Glu Leu Asp Leu Ser Gln Leu Asp Ala Ser Asp Phe Asp Ser Ala
      40           45           50           55

```



2/10

acg tgc ttt ggg gag ctg cag tgg tgc ccg gag acc tca gag aca gag	244
Thr Cys Phe Gly Glu Leu Gln Trp Cys Pro Glu Thr Ser Glu Thr Glu	
60 65 70	
ccc agc cag tac agc ccc gat gac tcc gag ctc ttc cag att gac agt	292
Pro Ser Gln Tyr Ser Pro Asp Asp Ser Glu Leu Phe Gln Ile Asp Ser	
75 80 85	
gag aat gaa gct ctc ttg gct gcg ctt acg aag acc ctg gat gac atc	340
Glu Asn Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu Thr Lys Thr Leu Asp Asp Ile	
90 95 100	
ccc gaa gac gat gtg ggg ctg gct gcc ttc cca gaa ctg gat gaa ggc	388
Pro Glu Asp Asp Val Gly Leu Ala Ala Phe Pro Glu Leu Asp Glu Gly	
105 110 115	
gac aca cca tcc tgc acc cca gcc tca cct gcc ccc tta tct gca ccc	436
Asp Thr Pro Ser Cys Thr Pro Ala Ser Pro Ala Pro Leu Ser Ala Pro	
120 125 130 135	
ccc agc ccc acc ctg gag agg ctt ctg tcc cca gcg tct gac gtg gac	484
Pro Ser Pro Thr Leu Glu Arg Leu Leu Ser Pro Ala Ser Asp Val Asp	
140 145 150	
gag ctt tca ctg cta cag aag ctc ctc ctg gcc aca tcc tcc cca aca	532
Glu Leu Ser Leu Leu Gln Lys Leu Leu Leu Ala Thr Ser Ser Pro Thr	
155 160 165	
gca agc tct gac gct ctg aag gac ggg gcc acc tgg tcc cag acc agc	580
Ala Ser Ser Asp Ala Leu Lys Asp Gly Ala Thr Trp Ser Gln Thr Ser	
170 175 180	
ctc agt tcc aga agt cag cgg cct tgt gtc aag gtg gat ggc acc cag	628
Leu Ser Ser Arg Ser Gln Arg Pro Cys Val Lys Val Asp Gly Thr Gln	
185 190 195	
gat aag aag acc ccc aca ctg cgg gct cag agc cgg cct tgt acg gaa	676
Asp Lys Lys Thr Pro Thr Leu Arg Ala Gln Ser Arg Pro Cys Thr Glu	
200 205 210 215	
ctg cat aag cac ctc act tcg gtg ctg ccc tgt ccc aga gtg aaa gcc	724
Leu His Lys His Leu Thr Ser Val Leu Pro Cys Pro Arg Val Lys Ala	

3/10

220	225	230	
tgc tcc cca act ccg cac ccg agc cct cgg ctc ctc tcc aaa gag gag			772
Cys Ser Pro Thr Pro His Pro Ser Pro Arg Leu Leu Ser Lys Glu Glu			
235	240	245	
gag gag gag gtg ggg gag gat tgc cca agc cct tgg ctg act cca gcc			820
Glu Glu Glu Val Gly Glu Asp Cys Pro Ser Pro Trp Leu Thr Pro Ala			
250	255	260	
tcg ccc caa gac tcc cta gca cag gac acg gcc agc ccc gac agt gcc			868
Ser Pro Gln Asp Ser Leu Ala Gln Asp Thr Ala Ser Pro Asp Ser Ala			
265	270	275	
cag cct ccc gag gag gat gtg agg gcc atg gta cag ctc att cgc tac			916
Gln Pro Pro Glu Glu Asp Val Arg Ala Met Val Gln Leu Ile Arg Tyr			
280	285	290	295
atg cat acc tac tgc ctg cct cag agg aag ctg ccc caa cgg gcc cca			964
Met His Thr Tyr Cys Leu Pro Gln Arg Lys Leu Pro Gln Arg Ala Pro			
300	305	310	
gag cca atc ccc cag gcc tgc agc agc ctc tcc agg cag gtt caa ccc			1012
Glu Pro Ile Pro Gln Ala Cys Ser Ser Leu Ser Arg Gln Val Gln Pro			
315	320	325	
cga tcc cgg cat ccc ccc aaa gcc ttc tgg act gag ttc tct atc cta			1060
Arg Ser Arg His Pro Pro Lys Ala Phe Trp Thr Glu Phe Ser Ile Leu			
330	335	340	
agg gaa ctt ctg gcc caa gat atc ctc tgt gat gtt agc aag ccc tac			1108
Arg Glu Leu Leu Ala Gln Asp Ile Leu Cys Asp Val Ser Lys Pro Tyr			
345	350	355	
cgc ctg gcc ata cct gtc tat gct tcc ctc aca cct cag tcc agg ccc			1156
Arg Leu Ala Ile Pro Val Tyr Ala Ser Leu Thr Pro Gln Ser Arg Pro			
360	365	370	375
agg ccc ccc aag gac agt cag gcc tcc cct gcc cac tct gcc atg gca			1204
Arg Pro Pro Lys Asp Ser Gln Ala Ser Pro Ala His Ser Ala Met Ala			
380	385	390	
gaa gag gtg aga atc act gct tcc ccc aag agc acc ggg cct aga ccc			1252

4/10

Glu Glu Val Arg Ile Thr Ala Ser Pro Lys Ser Thr Gly Pro Arg Pro	
395 400 405	
agc ctg cgt cct ctg agg ctg gag gtg aaa cgg gat gtt aac aag cct	1300
Ser Leu Arg Pro Leu Arg Leu Glu Val Lys Arg Asp Val Asn Lys Pro	
410 415 420	
aca agg caa aag cgg gag gaa gat gag gag gag gag gag gaa gaa gaa	1348
Thr Arg Gln Lys Arg Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu	
425 430 435	
gaa gag gaa gaa gaa aaa gaa gag gaa gaa gag gag tgg ggc agg aag	1396
Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Trp Gly Arg Lys	
440 445 450 455	
aga cca ggt cgt ggc ctg cca tgg acc aaa cta ggg agg aag atg gac	1444
Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro Trp Thr Lys Leu Gly Arg Lys Met Asp	
460 465 470	
agc tcc gtg tgc ccc gtg cgg cgc tcc agg aga ctg aat cca gag ctg	1492
Ser Ser Val Cys Pro Val Arg Arg Ser Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu	
475 480 485	
ggt ccc tgg ctg aca ttc act gat gag ccc tta ggt gct ctg ccc tcg	1540
Gly Pro Trp Leu Thr Phe Thr Asp Glu Pro Leu Gly Ala Leu Pro Ser	
490 495 500	
atg tgc ctg gat aca gag acc cac aac ctg gag gaa gac ctg ggc agc	1588
Met Cys Leu Asp Thr Glu Thr His Asn Leu Glu Glu Asp Leu Gly Ser	
505 510 515	
ctc aca gac agt agt caa ggc cgg cag ctc ccc cag gga tcc cag atc	1636
Leu Thr Asp Ser Ser Gln Gly Arg Gln Leu Pro Gln Gly Ser Gln Ile	
520 525 530 535	
ccc gcc ctg gaa agc ccc tgt gag agt ggg tgc gga gac aca gat gaa	1684
Pro Ala Leu Glu Ser Pro Cys Glu Ser Gly Cys Gly Asp Thr Asp Glu	
540 545 550	
gat cca agc tgc cca cag ccc act tcc aga gac tcc tcc agg tgc ctc	1732
Asp Pro Ser Cys Pro Gln Pro Thr Ser Arg Asp Ser Ser Arg Cys Leu	
555 560 565	

5/10

atg ctg gcc ttg tca caa agc gac tct ctt ggc aag aag agc ttt gag Met Leu Ala Leu Ser Gln Ser Asp Ser Leu Gly Lys Lys Ser Phe Glu 570 575 580	1780
gag tcc ctg acg gtg gag ctt tgc ggc acg gca gga ctc acg cca ccc Glu Ser Leu Thr Val Glu Leu Cys Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro 585 590 595	1828
acc aca cct cca tac aag cca atg gag gag gac ccc ttc aag cca gac Thr Thr Pro Pro Tyr Lys Pro Met Glu Glu Asp Pro Phe Lys Pro Asp 600 605 610 615	1876
acc aag ctc agc cca ggc caa gac aca gct ccc agc ctt ccc tcc ccc Thr Lys Leu Ser Pro Gly Gln Asp Thr Ala Pro Ser Leu Pro Ser Pro 620 625 630	1924
gag gct ctt ccg ctc aca gcc acc cca gga gct tcc cac aag ctg ccc Glu Ala Leu Pro Leu Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ser His Lys Leu Pro 635 640 645	1972
aag agg cac cca gag cga agc gag ctc ctg tcc cat ttg cag cat gcc Lys Arg His Pro Glu Arg Ser Glu Leu Leu Ser His Leu Gln His Ala 650 655 660	2020
aca acc caa cca gtc tca cag gct ggc cag aag cgc ccc ttc tcc tgc Thr Thr Gln Pro Val Ser Gln Ala Gly Gln Lys Arg Pro Phe Ser Cys 665 670 675	2068
tcc ttt gga gac cac gac tac tgc cag gtg ctc agg cca gag gct gcc Ser Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln Val Leu Arg Pro Glu Ala Ala 680 685 690 695	2116
ctg cag agg aag gtg ctg cgg tcc tgg gag cca atc ggg gtc cac ctt Leu Gln Arg Lys Val Leu Arg Ser Trp Glu Pro Ile Gly Val His Leu 700 705 710	2164
gaa gac ttg gcc cag cag ggt gcc cct ctg cca acg gaa aca aag gcc Glu Asp Leu Ala Gln Gln Gly Ala Pro Leu Pro Thr Glu Thr Lys Ala 715 720 725	2212
cct agg agg gag gca aac cag aac tgt gac cct acc cac aag gac agc Pro Arg Arg Glu Ala Asn Gln Asn Cys Asp Pro Thr His Lys Asp Ser 730 735 740	2260

6/10

atg cag cta aga gac cat gag atc cgt gcc agt ctc aca aag cac ttt	2308
Met Gln Leu Arg Asp His Glu Ile Arg Ala Ser Leu Thr Lys His Phe	
745 750 755	
ggg ctg ctg gag act gct ctg gaa ggt gaa gac ctg gcg tcc tgt aaa	2356
Gly Leu Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly Glu Asp Leu Ala Ser Cys Lys	
760 765 770 775	
agc ccg gag tat gac acc gta ttt gag gac agc agc agc agc agt ggc	2404
Ser Pro Glu Tyr Asp Thr Val Phe Glu Asp Ser Ser Ser Ser Gly	
780 785 790	
gag agt agc ttc ctg ctt gag gag gag gag gaa gag gag gag gga ggg	2452
Glu Ser Ser Phe Leu Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly	
795 800 805	
gaa gag gac gat gaa gga gag gac tca ggg gtc agc cct ccc tgc tct	2500
Glu Glu Asp Asp Glu Gly Glu Asp Ser Gly Val Ser Pro Pro Cys Ser	
810 815 820	
gat cac tgc ccc tac cag agc cca ccc agt aag gcc agt cgg cag ctc	2548
Asp His Cys Pro Tyr Gln Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Arg Gln Leu	
825 830 835	
tgc tcc cga agc cgc tcc agt tcc ggc tcc tcg tcc tgc agc tcc tgg	2596
Cys Ser Arg Ser Arg Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Cys Ser Ser Trp	
840 845 850 855	
tca cca gcc acc cgg aag aac ttc aga cgt gag agc aga ggg ccc tgt	2644
Ser Pro Ala Thr Arg Lys Asn Phe Arg Arg Glu Ser Arg Gly Pro Cys	
860 865 870	
tca gat gga acc cca agc gtc cgg cat gcc agg aag cgg cgg gaa aag	2692
Ser Asp Gly Thr Pro Ser Val Arg His Ala Arg Lys Arg Arg Glu Lys	
875 880 885	
gcc atc ggt gaa ggc cgt gtg gta tac att cga aat ctc tcc agt gac	2740
Ala Ile Gly Glu Gly Arg Val Val Tyr Ile Arg Asn Leu Ser Ser Asp	
890 895 900	
atg agc tct cgg gaa cta aag aag cgc ttt gag gtg ttc ggt gag att	2788
Met Ser Ser Arg Glu Leu Lys Lys Arg Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile	

7/10

905

910

915

gta gag tgc cag gtg ctg acg aga agt aaa aga ggc cag aag cac ggt 2836  
 Val Glu Cys Gln Val Leu Thr Arg Ser Lys Arg Gly Gln Lys His Gly  
 920 925 930 935

ttt atc acc ttc cgg tgt tca gag cac gct gcc ctg tcc gtg agg aac 2884  
 Phe Ile Thr Phe Arg Cys Ser Glu His Ala Ala Leu Ser Val Arg Asn  
 940 945 950

ggc gcc acc ctg aga aag cgc aat gag ccc tcc ttc cac ctg agc tat 2932  
 Gly Ala Thr Leu Arg Lys Arg Asn Glu Pro Ser Phe His Leu Ser Tyr  
 955 960 965

gga ggg ctc cgg cac ttc cgt tgg ccc aga tac act gac tat gat ccc 2980  
 Gly Gly Leu Arg His Phe Arg Trp Pro Arg Tyr Thr Asp Tyr Asp Pro  
 970 975 980

aca tct gag gag tcc ctt ccc tca tct ggg aaa agc aag tac gaa gcc 3028  
 Thr Ser Glu Glu Ser Leu Pro Ser Ser Gly Lys Ser Lys Tyr Glu Ala  
 985 990 995

atg gat ttt gac agc tta ctg aaa gag gcc cag cag agc ctg cat tga 3076  
 Met Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Gln Ser Leu His  
 1000 1005 1010 1015

tatcagcctt aaccttcgag gaatacctca atacctcaga caaggccctt ccaatatgtt 3136

tacgttttca aagaaaagag tatatgagaa ggagagcgag cgagcgagcg agcgagcgag 3196

tgagcgtgag agatcacaca ggagagagaa agacttgaat ctgctgtcgt ttcctttaaa 3256

aaaaaaaaa aaaaaactcg acggccaagt cggcctcct ttagtgaggg ttaatttgtg 3316

atcccgggtg gcatccctgt gacccctcc 3345

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1014

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

8/10

Met Ala Gly Asn Asp Cys Gly Ala Leu Leu Asp Glu Glu Leu Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Leu Asn Tyr Leu Ser Asp Thr Gln Gly Gly Asp Ser Gly Glu  
 20 25 30  
 Glu Gln Leu Cys Ala Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Gln Leu Asp  
 35 40 45  
 Ala Ser Asp Phe Asp Ser Ala Thr Cys Phe Gly Glu Leu Gln Trp Cys  
 50 55 60  
 Pro Glu Thr Ser Glu Thr Glu Pro Ser Gln Tyr Ser Pro Asp Asp Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Leu Phe Gln Ile Asp Ser Glu Asn Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu  
 85 90 95  
 Thr Lys Thr Leu Asp Asp Ile Pro Glu Asp Asp Val Gly Leu Ala Ala  
 100 105 110  
 Phe Pro Glu Leu Asp Glu Gly Asp Thr Pro Ser Cys Thr Pro Ala Ser  
 115 120 125  
 Pro Ala Pro Leu Ser Ala Pro Pro Ser Pro Thr Leu Glu Arg Leu Leu  
 130 135 140  
 Ser Pro Ala Ser Asp Val Asp Glu Leu Ser Leu Leu Gln Lys Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Thr Ser Ser Pro Thr Ala Ser Ser Asp Ala Leu Lys Asp Gly  
 165 170 175  
 Ala Thr Trp Ser Gln Thr Ser Leu Ser Ser Arg Ser Gln Arg Pro Cys  
 180 185 190  
 Val Lys Val Asp Gly Thr Gln Asp Lys Lys Thr Pro Thr Leu Arg Ala  
 195 200 205  
 Gln Ser Arg Pro Cys Thr Glu Leu His Lys His Leu Thr Ser Val Leu  
 210 215 220  
 Pro Cys Pro Arg Val Lys Ala Cys Ser Pro Thr Pro His Pro Ser Pro  
 225 230 235 240  
 Arg Leu Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Val Gly Glu Asp Cys Pro  
 245 250 255  
 Ser Pro Trp Leu Thr Pro Ala Ser Pro Gln Asp Ser Leu Ala Gln Asp  
 260 265 270  
 Thr Ala Ser Pro Asp Ser Ala Gln Pro Pro Glu Glu Asp Val Arg Ala  
 275 280 285  
 Met Val Gln Leu Ile Arg Tyr Met His Thr Tyr Cys Leu Pro Gln Arg  
 290 295 300  
 Lys Leu Pro Gln Arg Ala Pro Glu Pro Ile Pro Gln Ala Cys Ser Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Arg Gln Val Gln Pro Arg Ser Arg His Pro Pro Lys Ala Phe  
 325 330 335  
 Trp Thr Glu Phe Ser Ile Leu Arg Glu Leu Leu Ala Gln Asp Ile Leu

9/10

340 345 350  
 Cys Asp Val Ser Lys Pro Tyr Arg Leu Ala Ile Pro Val Tyr Ala Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Pro Gln Ser Arg Pro Arg Pro Pro Lys Asp Ser Gln Ala Ser  
 370 375 380  
 Pro Ala His Ser Ala Met Ala Glu Glu Val Arg Ile Thr Ala Ser Pro  
 385 390 395 400  
 Lys Ser Thr Gly Pro Arg Pro Ser Leu Arg Pro Leu Arg Leu Glu Val  
 405 410 415  
 Lys Arg Asp Val Asn Lys Pro Thr Arg Gln Lys Arg Glu Glu Asp Glu  
 420 425 430  
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu  
 435 440 445  
 Glu Glu Glu Trp Gly Arg Lys Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro Trp Thr  
 450 455 460  
 Lys Leu Gly Arg Lys Met Asp Ser Ser Val Cys Pro Val Arg Arg Ser  
 465 470 475 480  
 Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Gly Pro Trp Leu Thr Phe Thr Asp Glu  
 485 490 495  
 Pro Leu Gly Ala Leu Pro Ser Met Cys Leu Asp Thr Glu Thr His Asn  
 500 505 510  
 Leu Glu Glu Asp Leu Gly Ser Leu Thr Asp Ser Ser Gln Gly Arg Gln  
 515 520 525  
 Leu Pro Gln Gly Ser Gln Ile Pro Ala Leu Glu Ser Pro Cys Glu Ser  
 530 535 540  
 Gly Cys Gly Asp Thr Asp Glu Asp Pro Ser Cys Pro Gln Pro Thr Ser  
 545 550 555 560  
 Arg Asp Ser Ser Arg Cys Leu Met Leu Ala Leu Ser Gln Ser Asp Ser  
 565 570 575  
 Leu Gly Lys Lys Ser Phe Glu Glu Ser Leu Thr Val Glu Leu Cys Gly  
 580 585 590  
 Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr Pro Pro Tyr Lys Pro Met Glu  
 595 600 605  
 Glu Asp Pro Phe Lys Pro Asp Thr Lys Leu Ser Pro Gly Gln Asp Thr  
 610 615 620  
 Ala Pro Ser Leu Pro Ser Pro Glu Ala Leu Pro Leu Thr Ala Thr Pro  
 625 630 635 640  
 Gly Ala Ser His Lys Leu Pro Lys Arg His Pro Glu Arg Ser Glu Leu  
 645 650 655  
 Leu Ser His Leu Gln His Ala Thr Thr Gln Pro Val Ser Gln Ala Gly  
 660 665 670  
 Gln Lys Arg Pro Phe Ser Cys Ser Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln  
 675 680 685



10/10

Val Leu Arg Pro Glu Ala Ala Leu Gln Arg Lys Val Leu Arg Ser Trp  
 690 695 700  
 Glu Pro Ile Gly Val His Leu Glu Asp Leu Ala Gln Gln Gly Ala Pro  
 705 710 715 720  
 Leu Pro Thr Glu Thr Lys Ala Pro Arg Arg Glu Ala Asn Gln Asn Cys  
 725 730 735  
 Asp Pro Thr His Lys Asp Ser Met Gln Leu Arg Asp His Glu Ile Arg  
 740 745 750  
 Ala Ser Leu Thr Lys His Phe Gly Leu Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly  
 755 760 765  
 Glu Asp Leu Ala Ser Cys Lys Ser Pro Glu Tyr Asp Thr Val Phe Glu  
 770 775 780  
 Asp Ser Ser Ser Ser Ser Gly Glu Ser Ser Phe Leu Leu Glu Glu Glu  
 785 790 795 800  
 Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Glu Glu Asp Asp Glu Gly Glu Asp Ser  
 805 810 815  
 Gly Val Ser Pro Pro Cys Ser Asp His Cys Pro Tyr Gln Ser Pro Pro  
 820 825 830  
 Ser Lys Ala Ser Arg Gln Leu Cys Ser Arg Ser Arg Ser Ser Ser Gly  
 835 840 845  
 Ser Ser Ser Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Thr Arg Lys Asn Phe Arg  
 850 855 860  
 Arg Glu Ser Arg Gly Pro Cys Ser Asp Gly Thr Pro Ser Val Arg His  
 865 870 875 880  
 Ala Arg Lys Arg Arg Glu Lys Ala Ile Gly Glu Gly Arg Val Val Tyr  
 885 890 895  
 Ile Arg Asn Leu Ser Ser Asp Met Ser Ser Arg Glu Leu Lys Lys Arg  
 900 905 910  
 Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile Val Glu Cys Gln Val Leu Thr Arg Ser  
 915 920 925  
 Lys Arg Gly Gln Lys His Gly Phe Ile Thr Phe Arg Cys Ser Glu His  
 930 935 940  
 Ala Ala Leu Ser Val Arg Asn Gly Ala Thr Leu Arg Lys Arg Asn Glu  
 945 950 955 960  
 Pro Ser Phe His Leu Ser Tyr Gly Gly Leu Arg His Phe Arg Trp Pro  
 965 970 975  
 Arg Tyr Thr Asp Tyr Asp Pro Thr Ser Glu Glu Ser Leu Pro Ser Ser  
 980 985 990  
 Gly Lys Ser Lys Tyr Glu Ala Met Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu  
 995 1000 1005  
 Ala Gln Gln Ser Leu His  
 1010

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Classification No.

PCT/JP03/10163

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/50, 33/15, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N33/50, 33/15, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/26365 A (Kazusa DNA Research Institute Foundation), 11 May, 2000 (11.05.00), & AU 3788500 A	1
A	JP 2002-58489 A (Osaka Bioscience Institute), 26 February, 2002 (26.02.02), (Family: none)	1
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.272, No.50, (1997), pages 31693 to 31699	1
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Vol.17, (1997), pages 5400 to 5409	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 November, 2003 (18.11.03)Date of mailing of the international search report  
09 December, 2003 (09.12.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/10163

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 2  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
It is unclear what specific substances are involved in the scope of the substance specified by the screening method and, therefore, a remedy containing the same as the active ingredient is unclear too.
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(1) Claims 1 and 2 relate to a method of screening the active ingredient of a remedy for obesity and/or diabetes and a remedy for obesity and/or diabetes.

(2) Claim 3 relates to a transgenic nonhuman animal showing overexpression of a ligand ERRL1.

The groups of inventions (1) and (2) as described above are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 2

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50、33/15、C12Q1/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50、33/15、C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/26365 A (財団法人かずさディー・エヌ・エー 研究所) 2000. 05. 11 & AU 3788500 A	1
A	JP 2002-58489 A (財団法人大阪バイオサイエンス 研究所) 2002. 02. 26 (ファミリーなし)	1
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL. 272, NO. 50, (1997) p. 31693-31699	1
Y	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, VOL. 17, (1997), p. 5400-5409	1

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 11. 03

国際調査報告の発送日

001203

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 2 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、スクリーニング方法によって特定された物質には具体的にどのような物質が含まれるか不明確であり、それを有効成分として含有する治療薬も同様に不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

- (1) 請求の範囲1, 2は肥満および/または糖尿病の治療薬の有効成分をスクリーニングする方法、肥満および/または糖尿病の治療薬に関するものである。  
(2) 請求の範囲3は、リガンド因子ERRL1を過剰発現するトランスジェニック非ヒト動物に関するものである。

そして、上記(1)、(2)の発明群が単一の一般的発明概念を形成をするように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1, 2

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**